

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Факультет фундаментальной медицины

На правах рукописи

Чечехин Вадим Игоревич

Регуляция мультипотентных мезенхимных стромальных клеток катехоламинами: сенситизация $\alpha 1$ -адренорецепторов, управление фенотипом, возможное участие в развитии артериальной гипертензии, вызванной ожирением

1.5.5 — Физиология человека и животных

1.5.4 — Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент Тюрин-Кузьмин П.А.

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор, академик РАН Ткачук В.А.

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины.

Научный
руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич

Научный
консультант:

доктор биологических наук, профессор, академик РАН
Ткачук Всеволод Арсеньевич

Официальные
оппоненты:

Мазурина Наталия Валентиновна, доктор медицинских наук, Государственный научный центр Российской Федерации Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ведущий научный сотрудник

Ельчанинов Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», заведующий лабораторией

Ведущая
организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова Российской академии наук

Защита состоится « » _____ 2024 года на заседании диссертационного совета 24.1.023.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, 76 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук и на сайте «<http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Chechehin2023/Chechehin2023.html>»

Автореферат разослан « » _____ 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Светлана Викторовна Поддубко

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) располагаются периваскулярно в строме большинства органов человека и являются ключевыми регуляторами гомеостаза тканей организма человека. Функциональная активность МСК находится под строгим нейроэндокринным контролем. Так, в костном мозге именно к МСК подходят окончания симпатической нервной системы (Isern and Méndez-ferrer, 2011). А периваскулярное расположение клеток позволяет им первыми воспринимать гормональные сигналы эндокринной системы. Воспринимая гормональные стимулы и сигналы нервной системы, МСК, в свою очередь, секретируют множество факторов роста и цитокинов, формируя паракринный фон в ткани. Кроме того, МСК могут дифференцироваться в некоторые типы клеток, например, адипоциты, остеобласты и гладкомышечные клетки. За счет дифференцировки и секреторной активности эти клетки напрямую участвуют в обновлении тканей, репарации повреждений и регенерации (Naji et al., 2019). Эти функции позволяют использовать МСК и продуцируемые ими паракринные факторы для поиска новых методов терапии различных заболеваний (Kalinina et al., 2011; Sabol et al., 2021; Si et al., 2019).

Одним из основных регуляторов функций МСК является норадреналин. Ранее было показано, что норадреналин способен вызывать в МСК уникальный феномен гетерологической сенситизации $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Данный феномен заключается в β -адренорецептор-зависимом повышении экспрессии функционально активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов. В связи с этим при повторном воздействии норадреналина на МСК активируется преимущественно не β -адренорецептор/цАМФ сигнальный путь, а $\alpha 1A$ -адренорецепторы и их сигнальный каскад Gq/ФЛЦ/ИФ₃/Ca²⁺. В результате в большем количестве клеток происходит повышение концентрации внутриклеточного кальция (Tyurin-Kuzmin et al., 2016). Однако, физиологическое и медицинское значение данного феномена не выяснено.

Норадреналин является основным нейромедиатором симпатической нервной системы. Для того чтобы вызывать феномен гетерологической сенситизации необходимо стабильное повышение активности симпатической нервной системы. Одним из наиболее распространенных заболеваний, сопровождающихся повышением активности симпатической нервной системы, является ожирение. Гиперактивация симпатической нервной системы при ожирении часто является одной из основных причин развития артериальной гипертензии. При этом ожирение почти всегда приводит к развитию гиперактивации симпатической нервной системы, но не всегда сопряжено с развитием артериальной гипертензии. Согласно полученным нами данным, мы предлагаем новую модель механизма развития артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Гиперактивация симпатической нервной системы может реализовываться как

первичное воздействие норадреналина, активирующего β -адренорецепторы. Это может приводить к повышению количества $\alpha 1A$ -адренорецепторов на сосудах пациентов с ожирением. Увеличение количества функционально активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов, в свою очередь, вызывает усиление вазоконстрикции при действии норадреналина. Усиление вазоконстрикции реализуется в росте общего периферического сосудистого сопротивления, что может приводить к развитию артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. В данной работе мы исследовали молекулярные механизмы участия МСК и уникального феномена гетерологической сенситизации $\alpha 1A$ -адренорецепторов в развитии артериальной гипертензии у пациентов с ожирением.

Цель исследования: установить молекулярные механизмы регуляции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток катехоламинами.

Задачи исследования:

1. Установить сигнальные каскады, активация которых приводит к адренергической сенситизации мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в ответ на моделирование гиперактивации симпатической нервной системы.
2. Проанализировать влияние норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на транскриптом мультипотентных стромальных клеток на уровне одиночных клеток.
3. Исследовать контрактильность мультипотентных стромальных клеток после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы.
4. Исследовать адренергическую сигнализацию в ответ на моделирование гиперактивации симпатической нервной системы в одиночных мультипотентных мезенхимных стромальных клетках пациентов с ожирением, страдающих артериальной гипертензией, и пациентов с ожирением, но без артериальной гипертензии.
5. Сравнить экспрессию $\alpha 1A$ -адренорецепторов в сосудистых клетках жировой ткани пациентов с ожирением, страдающих артериальной гипертензией, и пациентов с ожирением, но без артериальной гипертензии.

Научная новизна. В рамках данной работы впервые проведено исследование участия МСК жировой ткани в развитии артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. Установлено, что МСК в сосудах жировой ткани непосредственно иннервированы окончаниями симпатической нервной системы. Изучен механизм норадреналин-зависимого повышения чувствительности клеток к катехоламинам. Обнаружено, что норадреналин-зависимое повышение чувствительности МСК к катехоламинам вызвано увеличением экспрессии функционально активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Также, установлено, что механизм норадреналин-зависимого повышения экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов зависит от активации

β_3 -адренорецепторов и сигнального каскада Gs/аденилатциклаза/цАМФ/протеинкиназа А и повышением трансляции белка рецептора, но не транскрипции мРНК. Также, было показано, что β_3 -адренорецепторы в сосудах жировой ткани локализуются на МСК, а не на других клетках. В результате анализа транскриптома одиночных клеток впервые показано, что при воздействии норадреналина после повышения экспрессии α_1A -адренорецепторов МСК переходят в ГМК-подобный фенотип. Изменения транскриптома были подтверждены функциональным тестом на способность МСК к контракции на модели МСК-коллагеновых дисков. Было продемонстрировано наличие корреляции между способностью МСК к норадреналин-зависимому повышению экспрессии α_1A -адренорецепторов и наличием артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. С помощью анализа чувствительности МСК к норадреналину установлено, что наличие сенситизации МСК к норадреналину коррелирует с уровнем артериального давления у пациентов с ожирением. Кроме того, обнаружены различия в локализации α_1A -адренорецепторов в сосудах жировой ткани пациентов с ожирением. Было показано, что у пациентов с ожирением без артериальной гипертензии α_1A -адренорецепторы локализуются только на МСК, тогда как у пациентов с ожирением и артериальной гипертензией α_1A -адренорецепторы также обнаруживаются на α -SMA экспрессирующих клетках. Результаты данной работы указывают на новый механизм развития артериальной гипертензии у пациентов с ожирением.

Теоретическая и практическая значимость. Данная работа расширяет понимание патологических механизмов развития артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. МСК и уникальный феномен повышения чувствительности к норадреналину могут стать одной из терапевтических мишеней для разработки новых методов лечения пациентов с ожирением и артериальной гипертензией. Применение ингибиторов β_3 -адренорецепторов может быть перспективным для блокирования развития патологического механизма повышения чувствительности сосудов к норадреналину при ожирении.

Личный вклад автора заключается в постановке задач, планировании и проведении экспериментов, анализе, оформлении и представлении результатов на научных конференциях и подготовке статей к публикации в научных журналах.

Положения, выносимые на защиту.

1. При моделировании гиперактивации симпатической нервной системы в культуре МСК повышается чувствительность клеток к норадреналину за счет повышения экспрессии α_1A -адренорецепторов.
2. Повышение чувствительности МСК к норадреналину осуществляется за счет активации сигнального каскада β_3 -АР/АЦ/цАМФ/ПКА и повышения трансляции молекул рецептора, но не транскрипции его мРНК.

3. Воздействие норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на МСК приводит к переходу клеток в ГМК-подобный фенотип. Переход МСК в ГМК-подобный фенотип приводит к повышению контрактильности клеток.
4. У пациентов с ожирением и артериальной гипертензией моделирование гиперактивации симпатической нервной системы вызывает повышение чувствительности МСК к норадреналину. У пациентов с ожирением без артериальной гипертензии моделирование гиперактивации симпатической нервной системы не влияет на чувствительность МСК к норадреналину.
5. У пациентов с ожирением без артериальной гипертензии $\alpha 1A$ -адренорецепторы выявляются в перичитах, но не в гладкомышечных клетках. У пациентов с ожирением и артериальной гипертензией $\alpha 1A$ -адренорецепторы выявляются не только в перичитах, но и в гладкомышечных клетках.

Степень достоверности результатов проведённых исследований. Диссертационная работа выполнена с использованием современных методов биохимии, клеточной и молекулярной биологии, к которым была применена адекватная статистическая обработка данных.

Апробация работы. Официальная апробация диссертационной работы состоялась 30.03.2023г на расширенном заседании кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины и института регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты диссертации были представлены на научных конференциях: III Объединенный Научный Форум (Сочи, 2022), IV научно-практическая школа «Анализ отдельных клеток» (Томск, 2022), II Объединенный Научный Форум (Дагомыс, 2019), IX (XXVIII) Национальный диабетологический конгресс «Сахарный диабет и ожирение – неинфекционные междисциплинарные пандемии XXI века» (Москва, 2022), IV Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019), V Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2022).

Публикации. По материалам работы опубликованы 8 статей в рецензируемых журналах, соответствующих перечню ВАК, из них 4 статьи, входящих в Q1, 10 тезисов докладов и материалов конференций и 9 статей в сборниках.

Материалы и методы

Иммуногистохимический анализ экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов в жировой ткани. Подкожную жировую ткань пациентов с травматологических операций получали из области живота в госпитале Бурденко. Все доноры дали добровольное информированное согласие. Локальные этические комитеты одобрили протокол исследования. Образец ткани помещали в реагент tissue-tek ovt compound (Sakura Inc.) и замораживали в жидком азоте. Далее образцы инкубировали в смеси бычьей и ослиной сывороток и со специфическими первичными и вторичными антителами последовательно по 1 часу. Для оценки локализации адренорецепторов и сосудистых клеток проводили двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: срезы инкубировали со смесью антител к $\alpha 1A$ - (ab137123, Abcam), $\alpha 1B$ - (ab169523, Abcam), $\alpha 1D$ - (sc-390884, Santa Cruz), $\beta 3$ -адренорецепторам (Abnova, H00000155-B01P) и/или антител к эндотелиальным клеткам (CD31, IR610, Dako), или ГМК (α -SMA, M0851, Dako), или МСК (PDGFR β , P7679, Sigma-Aldrich), или симпатическим нервам (тирозингидроксилаза, AB152, Sigma-Aldrich). Ядра клеток окрашивали DAPI (D9542, Sigma-Aldrich). Изображения были получены с использованием конфокального микроскопа LSM 780, программного обеспечения ZEN2010 (Zeiss) и ImageJ (NIH) (Schindelin et al., 2012).

Выделение и культивирование первичной культуры МСК. Первичные культуры МСК выделяли из подкожной жировой ткани человека в соответствии с протоколом, описанном ранее (Mushahary et al., 2018). Ткань измельчали и осуществляли ферментативное расщепление при 37°C в течение 1 часа в растворе коллагеназы и диспазы. Полученную смесь центрифугировали и аспирировали верхние слои жира и супернатанта, оставляя клетки на дне пробирки. Клетки помещали на чашки Петри в среду роста AdvanceSTEM Mesenchymal Stem Cells Media, содержащую 10% Supplement (HyClone) и 1% раствор антибиотиков и антимикотика. Первичные культуры и линию ASC52telo вели на 60 мм чашках при температуре 37°C и с 5% содержанием CO₂. Пересаживали МСК в отношении 1:3 с помощью растворов Версена и трипсина (П034, ПанЭко) при достижении 90% монослоя. Для экспериментов использовали первичные МСК, культивируемые в течение 4-5 пассажей.

Ca²⁺-сигнализация. Функциональные ответы МСК на норадреналин регистрировали на уровне одиночных клеток. За 1 день до эксперимента клетки высаживали на 24-луночный планшет в плотности 5% от монослоя. Активацию α -адренорецепторов определяли по изменению концентрации кальция в клетках в ответ на норадреналин (1 мкМ, ab120717, Abcam) с помощью флуоресцентного красителя Fluo8 (4 мкМ, ab142773, Abcam) в растворе Хэнкса с Хэпесом. Перед окрашиванием клетки промывали 3 раза с помощью 0,3 мл раствора Хэнкса. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon) и камерой Andor iXon

897 (Andor Technology) с программным обеспечением NIS-Elements (Nikon). Для регистрации кальциевых ответов на добавление норадреналина клетки снимали с интервалом 30 секунд в течение 10-15 минут. Определяемым показателем служило изменение доли отвечающих на норадреналин клеток по сравнению с контролем. Для исследования изменения чувствительности к катехоламинам клетки преинкубировали с норадреналином 1 мкМ в течение 1 часа за 6, 12, 24 часа до эксперимента. В экспериментах по исследованию сигнального каскада, активируемого при преинкубации с норадреналином, использовали специфические ингибиторы.

Анализ транскриптома одиночных клеток. МСК анализировали через 12 часов после второго воздействия норадреналина (Гиперактивация симпатической нервной системы - Норадреналин). Клетки открепляли также, как при пересадке. Далее суспензию пропускали через 70 мкм клеточное сито. Суспензии одиночных МСК преобразовали в библиотеки scRNA-seq с использованием реагентов Library & Gel Bead Kit v3.1 (10x Genomics). Затем образцы секвенировали с помощью Illumina HiSeq1500 параллельно. Данные о CD45- клетках стромально васкулярной фракции были взяты из базы данных NCBI GSE155960. Секвенированные образцы были проанализированы с помощью генома человека 38 версии (NCBI build 38, GRCh38) с использованием программного обеспечения Cell Ranger 6.1.2 (10x Genomics) (Guo et al., 2017). Качественно секвенированными клетками считали МСК со следующим набором характеристик: >2500 или <7500 регистрируемых генов, >7000 или <70000 уникальных молекулярных идентификаторов и <5% митохондриальных мРНК. Данные из образцов были обработаны с использованием Seurat 4.0.4, g:Profiler, velocity 0.17.16, scVelo 0.2.4, Dynverse и SCENIC (Aibar et al., 2017; Bergen et al., 2020; Hao et al., 2021; La Manno et al., 2018; Raudvere et al., 2019; Saelens et al., 2019).

Контракция МСК-коллагеновых дисков. Коллаген (PC11-NCL, Imtek) смешивали с клетками в DMEM LG. После полимеризации МСК-коллагеновые диски открепляли от стенок лунки с помощью среды роста. Через 30 мин и 6 часов после открепления диска добавляли норадреналин 1 мкМ на 1 час и затем отмывали. Площадь диска измеряли с помощью Nikon SMZ18. Для количественного анализа рассчитывали процент сокращения диска.

Иммунофлуоресцентный анализ локализации ПКА в одиночных клетках. За 1 день до эксперимента клетки высаживали на 24-луночный планшет в плотности 5% от монослоя. Для активации протеинкиназы А (ПКА) МСК инкубировали 30 минут с норадреналином 1 мкМ. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в пустой среде. После стимуляции клетки фиксировали в 4% параформальдегиде и инкубировали в 0,1% бычьим сывороточном альбумине, содержащем 10% нормальной ослиной сыворотки. Далее добавляли специфические первичные антитела против ПКА (PA5-70360, Thermo Fisher Scientific) на 1 ч. Затем добавляли вторичные антитела (A-11001, Thermo Fisher Scientific). Ядра клеток окрашивали DAPI (D9542,

Sigma-Aldrich). Изображения были получены с использованием конфокального микроскопа LSM 780 и программного обеспечения ZEN2010 (Zeiss).

Вестерн-блоттинг. Клетки высаживали на 100 мм чашки Петри в плотности 60% от монослоя. В соответствующих экспериментах при необходимости добавляли ингибитор CREB (666-15). Клетки стимулировали 1 мкМ раствором норадреналина в течение 1 часа. Через 1, 3, 6, 12 и 24 часов после стимуляции клетки лизировали с помощью 3-кратного SDS буфера. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда (BioRad). Блоттинг проводили с помощью белковых гелей Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels (BioRad), камеры для электрофореза Mini-PROTEAN 3, 0,45 мкм поливинилиденфторидных мембран (Amersham) и 5% обезжиренного молока, растворенного в TBST. Мембраны инкубировали с соответствующими первичными антителами в течение ночи и вторичными антителами в течение 1 часа. Детекцию белковых полос и количественный анализ осуществляли с помощью Clarity Western ECL (BioRad) и ChemiDoc Imaging System (BioRad).

ПЦР в реальном времени. Клетки от трех доноров стимулировали 1 мкМ норадреналином в течение 1 часа. Через 1, 3 и 6 часов после начала эксперимента выделяли РНК по протоколу из RNeasy Mini Handbook (QIAGEN). Обратную транскрипцию тотальной РНК проводили с помощью набора MMLV RT (Евроген). Полученную кДНК сразу использовали для ПЦР с использованием qPCRMix-HS SYBR (Евроген) в амплификаторе CFX96 Touch (BioRad). Каждую пробу анализировали в дубликатах. Количественный анализ был выполнен методом $\Delta\Delta C_t$.

CRISPR/Cas-опосредованный нокаут *ADRB2* и *ADRB3* в клетках ASC52telo. Для нокаута генов *ADRB2/ADRB3* использовалась пара лентивирусных конструкций. Сборку лентивирусных частиц (LVP) и трансдукцию культуры ASC52telo проводили, как описано ранее (Tyurin-Kuzmin et al., 2020). Для подтверждения нокаута *ADRB2* или *ADRB3* проводили секвенирование по Сэнгеру.

Статистический анализ. Проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 15 (Systat Software Inc.) и R-studio 1.4 (RStudio) с использованием теста Манна-Уитни, непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (ANOVA on ranks) с дальнейшим post-hoc анализом. Данные представляли как медиана, первый и третий квартиль. Критический уровень значимости определяли как $p < 0,05$.

Основные результаты и обсуждение

Регуляция чувствительности МСК к норадреналину. Для ряда тканей, в первую очередь, костного мозга, показано, что норадреналин является ключевым регулятором функций МСК (Isern and Méndez-ferrer, 2011). Используя иммуногистохимическую окраску, мы показали, что в жировой ткани периваскулярно расположенные МСК непосредственно иннервированы волокнами симпатической нервной системы (Рис. 1 А). Ранее в нашей лаборатории было показано, что МСК демонстрируют уникальный механизм регуляции адренергической чувствительности, при котором $\alpha 1A$ -адренорецепторы подвергаются гетерологической сенситизации. Данный феномен заключается в увеличении количества клеток, отвечающих на норадреналин повышением уровня внутриклеточного кальция через 6 часов после преинкубации с норадреналином. Причем повышение чувствительности связано со специфическим повышением экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Такая преинкубация клеток с норадреналином является моделью гиперактивации симпатической нервной системы, который развивается *in vivo* в ряде патологий (Grassi, 2010).

На первом этапе работы мы выяснили временные характеристики изменения экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов и чувствительности клеток к норадреналину. Мы моделировали гиперактивацию симпатической нервной системы путем стимуляции культуры МСК норадреналином (1 мкМ) в течение 1 часа. Далее анализировали экспрессию и функциональную активность $\alpha 1A$ -адренорецепторов в МСК жировой ткани. При помощи вестерн-блоттинга мы показали, что в результате моделирования гиперактивации симпатической нервной системы происходило транзиторное увеличение экспрессии $\alpha 1A$ -адренорецепторов. Уровень белка $\alpha 1A$ -адренорецепторов через 6 часов повышался в 2.22 раза [1,09; 2,98] ($p = 3.896 \cdot 10^{-7}$) и снижался к базальному уровню через 12 часов после воздействия норадреналина (Рис. 1 Б-В). Функциональную активность адренорецепторов определяли на уровне одиночных клеток по изменению цитоплазматического уровня кальция после воздействия норадреналина. Мы показали, что через 6 часов после преинкубации с норадреналином происходило увеличение доли клеток, чувствительных к норадреналину и отвечающих кальциевой сигнализацией. При этом увеличение чувствительности клеток являлось транзиторным и возвращалось к базальному уровню через 12 часов после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы (Рис. 1 Г). Эти данные коррелировали с изменением уровня белка $\alpha 1A$ -адренорецептора. Таким образом, воздействие норадреналина на МСК приводило к повышению количества функционально-активных $\alpha 1A$ -адренорецепторов в этих клетках.

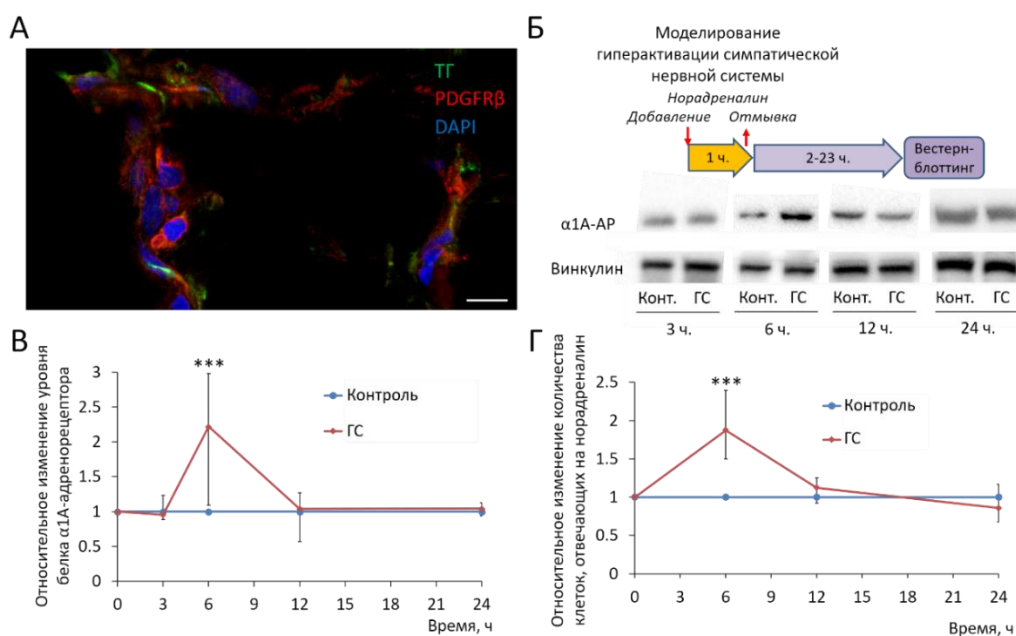


Рисунок 1. Норадреналин вызывает транзитное увеличение уровня $\alpha 1A$ -адренорецептора в МСК. А. PDGFR β ⁺ МСК напрямую иннервированы симпатическими нервными волокнами (зеленый - ТГ). Иммуногистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия. PDGFR β (красный) – β -тип рецептора тромбоцитарного фактора роста, ТГ (зеленый) – тирозин-гидроксилаза. Масштабный отрезок 10 мкм. Б. Репрезентативные картинки результатов вестерн-блоттинга $\alpha 1A$ -адренорецептора (ГС - норадреналин, 1 мкМ). В. Временная развертка относительного изменения уровня белка $\alpha 1A$ -адренорецептора в МСК при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. Г. Временная развертка относительного изменения количества клеток, отвечающих кальциевой сигнализацией на норадреналин после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. Масштабный отрезок 100 мкм, *** $p < 0,001$.

Активация $\beta 3$ -адренорецепторов приводила к сенситизации МСК за счет повышения уровня $\alpha 1A$ -адренорецептора. Повышение чувствительности клеток на гормон или нейромедиатор является нестандартным ответом клетки на действие этого же гормона или нейромедиатора. Обычно клетки десенситизируются при действии агонистов рецепторов. Так, например, β -адренорецепторы в кардиомиоцитах десенситизируются и даунрегулируются при длительном действии норадреналина (Port and Bristow, 2001). Однако, исходя из результатов, полученных ранее в нашей лаборатории, а также из косвенных литературных данных, известно, что стимулом к повышению $\alpha 1A$ -адренорецепторов является активация β -адренорецепторов (Stassen et al., 1998; Tyurin-Kuzmin et al., 2016). Для выяснения вклада отдельных изоформ β -адренорецепторов в наблюдаемый феномен мы воспользовались специфическими ингибиторами. Мы моделировали гиперактивацию симпатической нервной системы в присутствии селективных ингибиторов $\beta 1$ -, $\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецепторов (CGP20712, ICI-118551, SR59230A соответственно). Мы показали, что повышение $\alpha 1A$ -адренорецепторов в модели гиперактивации симпатической нервной системы было связано с преимущественной активацией $\beta 3$ - и в меньшей степени $\beta 2$ -адренорецепторов (Рис. 2 Б). Небольшое влияние ингибитора ICI-118551 на наблюдаемый эффект можно объяснить его частичным связыванием с $\beta 3$ -адренорецепторами ($K_i = 257$ нМ, что всего в 5 раз выше рабочей концентрации, использованной нами для блокады $\beta 2$ -адренорецепторов).

Для того чтобы независимо подтвердить результаты ингибиторного анализа, мы нокаутировали $\beta 2$ - и $\beta 3$ -адренорецепторы в МСК при помощи CRISPR/Cas9 технологии. Нокаут проводили в линии иммортализованных МСК жировой ткани ASC52telo, так как данная культура, в отличие от первичных культур МСК человека, с которыми мы работали во всех остальных экспериментах, может подвергаться длительному пассированию. Это позволяет сделать необходимые для нокаута манипуляции и требуемое количество экспериментов. Доля клеток ASC52telo, отвечающих кальциевой сигнализацией на норадреналин, была в 5,7 раз ($p = 1,258 \cdot 10^{-5}$) ниже первичных культур МСК жировой ткани. В то же время, иммортализованные МСК демонстрировали сходный с первичными клетками ответ на моделирование гиперактивации симпатической нервной системы, что нам позволило делать дальнейшие эксперименты (Tyurin-Kuzmin et al., 2018). Используя систему CRISPR/Cas9, мы по отдельности нокаутировали *ADRB2* (ген $\beta 2$ -адренорецептора) и *ADRB3* (ген $\beta 3$ -адренорецептора) в линии ASC52telo. Нокаут *ADRB3* полностью предотвращал усиление чувствительности клеток к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы, что подтвердило результаты ингибиторного анализа (Рис. 2 В-Г).

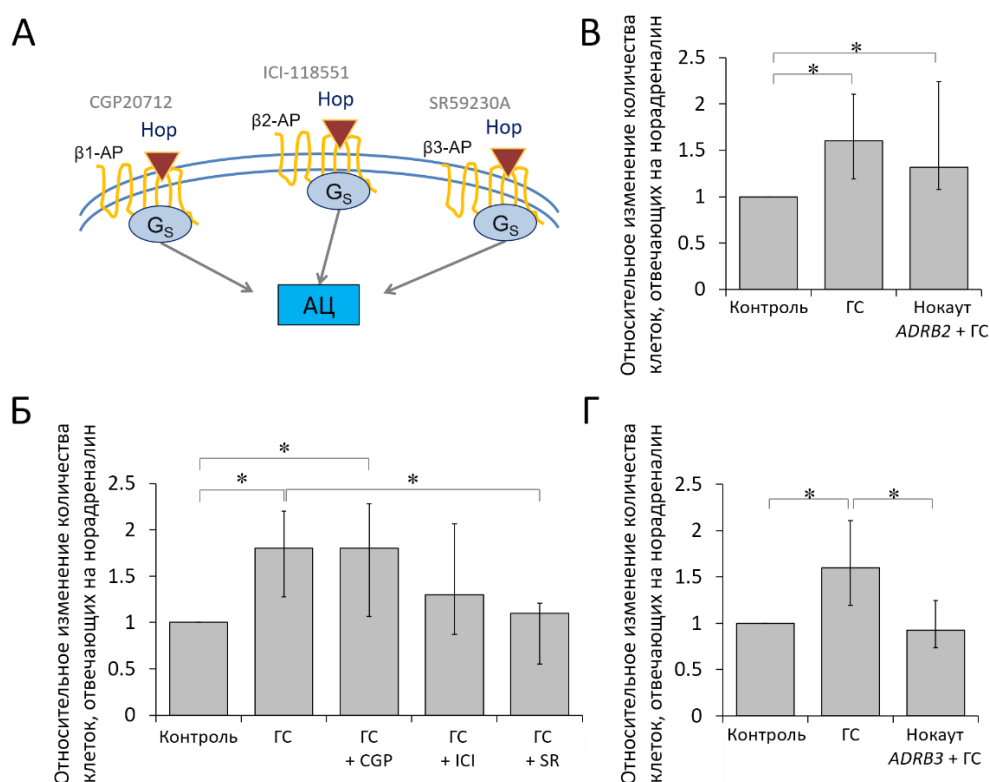


Рисунок 2. Определение изоформы β -адренорецепторов, ответственных за повышение чувствительности клеток к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. А. Разные изоформы β -адренорецепторов, ассоциированы с активацией аденилатциклазы. Б. Ингибиторный анализ β -адренорецепторов при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. В-Г. Нокаут $\beta 3$ -, но не $\beta 2$ -адренорецепторов в ASC52telo приводит к полному исчезновению сенситизации клеток к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). CGP (CGP20712, 100 нМ) - специфический ингибитор $\beta 1$ -адренорецепторов, ICI (ICI-118551, 50 нМ) - специфический ингибитор $\beta 2$ -адренорецепторов, SR (SR59230A, 250 нМ) - специфический ингибитор $\beta 3$ -адренорецепторов. * $p < 0,05$.

Иммуногистохимический анализ распределения β_3 -адренорецепторов в жировой ткани показал, что β_3 -адренорецепторы (зеленый на Рис. 3) экспрессировались преимущественно на клетках кровеносных сосудов, в значительной степени на МСК (Рис. 3). В качестве маркера эндотелиальных клеток мы выбрали CD31 (молекулой адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов 1 типа, красный на Рис. 4 А), являющийся одним из наиболее стабильно экспрессирующихся маркеров в сосудах разных органов и тканей (Pusztaszeri et al., 2006). Для идентификации контрактильных гладкомышечных клеток мы использовали α -SMA (α -гладкомышечный актин, красный на Рис. 3 Б), так как он является одним из наиболее специфических маркеров, связанных с функцией этих клеток (Basatemur et al., 2019). Мультипотентные стромальные клетки идентифицировали по наличию PDGFR β (β -тип рецептора тромбоцитарного фактора роста, красный на Рис. 3 В). Как показано ранее этот маркер воспроизводимо экспрессируется на 95-100% МСК разных доноров (Kalinina et al., 2015). Колоколизацию маркеров определяли при близком расположении или при наложении красного и зеленого цветов в одной клетке. Таким образом, можно предположить, что β_3 -адренорецептор, экспрессирующийся в сосудах жировой ткани, является ключевой мишенью для воздействия симпатической нервной системы, которое приводит к повышению чувствительности МСК к норадреналину.

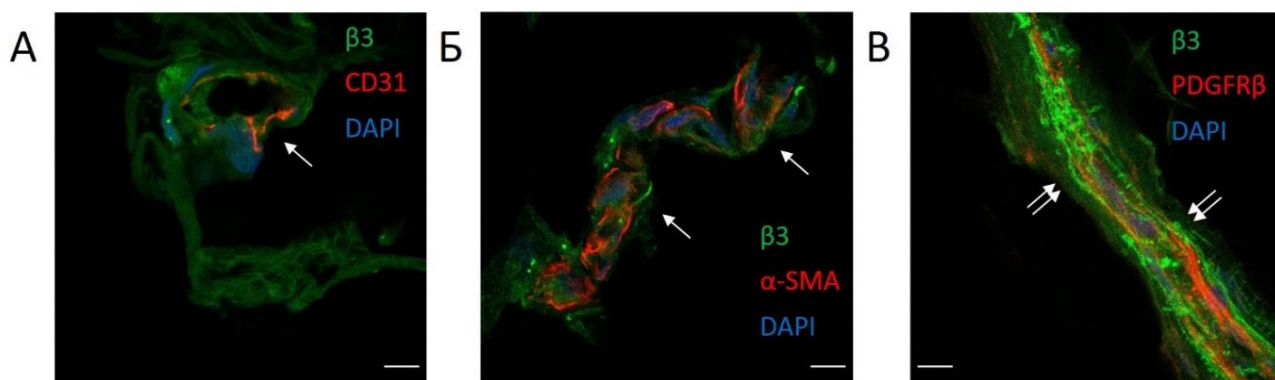


Рисунок 3. Распределение β_3 -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки человека. А. β_3 -адренорецепторы (зеленый) не экспрессируются CD31⁺ эндотелиальными клетками (красный, одиночные стрелки) в сосудах жировой ткани. Б. β_3 -адренорецепторы (зеленый) не экспрессируются α -SMA⁺ гладкомышечными клетками (красный, одиночные стрелки). В. β_3 -адренорецепторы экспрессируются PDGFR β ⁺ мезенхимными стромальными клетками (красный, двойные стрелки) в сосудах жировой ткани. Иммуногистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок 25 мкм.

Анализ сигнальных каскадов β_3 -адренорецепторов, ответственных за повышение уровня α_1A -адренорецепторов. Далее мы выяснили внутриклеточные сигнальные механизмы, приводящие к повышению чувствительности МСК к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. β -адренорецепторы классически активируют цАМФ-зависимый сигнальный каскад, запуская аденилатциклазу и синтез цАМФ с помощью G_s-белка. На Рис. 5 показана схема β_3 -адренорецептор/цАМФ-зависимого сигнального каскада, вклад компонентов которого мы проверяли при помощи ингибиторного анализа. Используя специфические ингибиторы аденилатциклазы (SQ22536), протеинкиназы А (Н89) и ЕРАС

(ESI09), мы показали, что для повышения чувствительности к норадреналину в модели гиперактивации симпатической нервной системы была необходима активация аденилатциклазы и протеинкиназы А, но не ЕРАС (Рис. 4 Б-Г).

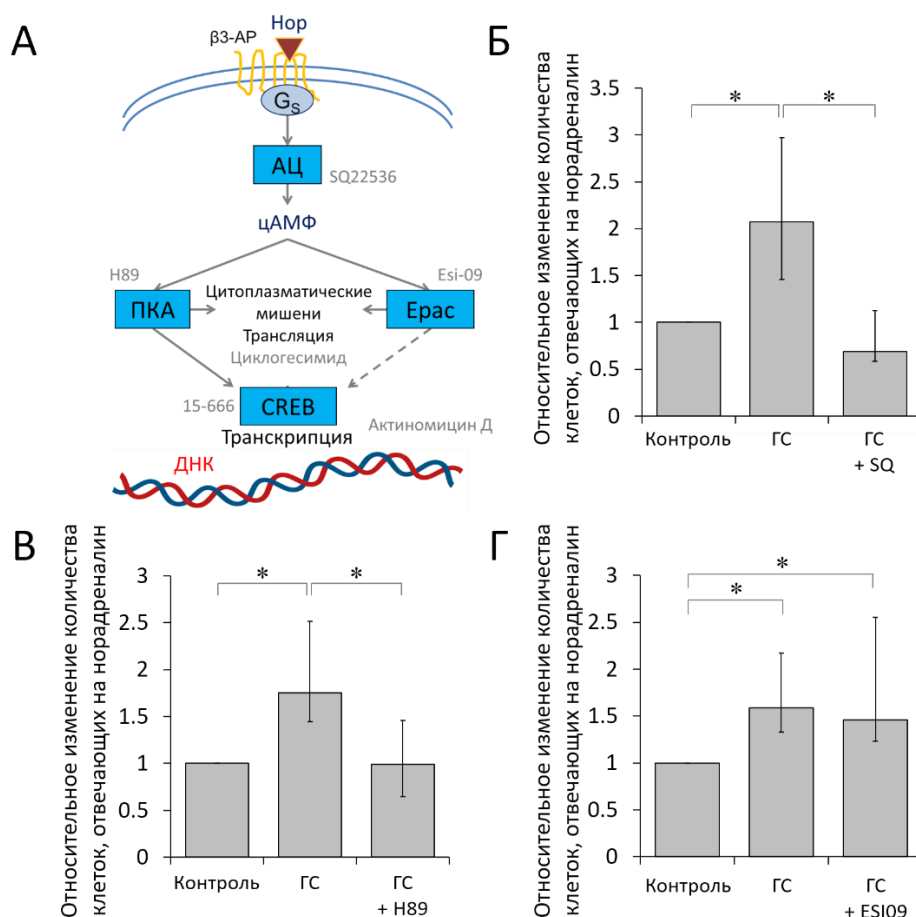


Рисунок 4. Сенситизация клеток к норадреналину опосредована активацией аденилатциклазы и протеинкиназы А. А. Схема сигнального каскада, запускаемого β3-адренорецептором. Б. Ингибирование аденилатциклазы (SQ - SQ22536, 1 мкМ) предотвращает сенситизацию клеток к норадреналину. В. Ингибирование протеинкиназы А (H89, 5 мкМ) предотвращает сенситизацию клеток к норадреналину. Г. Ингибирование ЕРАС (ESI09, 10 мкМ) не влияет на сенситизацию клеток к норадреналину. ГС – гиперактивация симпатической нервной системы, * p < 0,05.

На промоторной области гена α1А-адренорецептора одними из наиболее часто встречающихся являются последовательности, регулируемые цАМФ (CRE-последовательности), связывающие CREB (Razik et al., 1997). CREB – транскрипционный фактор, активирующийся при фосфорилировании протеинкиназой А, вошедшей в ядро клетки. Используя иммунофлуоресцентный анализ, мы проанализировали локализацию протеинкиназы А при действии норадреналина. Мы показали, что при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы протеинкиназа А не входила в ядро клетки (Рис. 5 А-Б). При этом уровень фосфорилирования CREB не изменялся после воздействия норадреналина. Ингибитор фосфорилирования CREB не влиял на сенситизацию МСК к норадреналину (Рис. 5 В-Д). Таким образом, протеинкиназа А в модели гиперактивации симпатической нервной системы

регулировала уровень $\alpha 1A$ -адренорецептора, воздействуя на цитоплазматические мишени. Используя неспецифические ингибиторы трансляции (циклогексимид) и транскрипции (актиномицин Д), мы проанализировали вклад трансляции и транскрипции в норадреналин-зависимое повышение чувствительности к норадреналину. Ингибирование трансляции, но не транскрипции, приводило к нивелированию норадреналин-зависимого повышения чувствительности клеток к норадреналину. Уровень мРНК $\alpha 1A$ -адренорецептора при длительном воздействии норадреналина также не изменялся. Из этих данных следует, что повышение чувствительности МСК к норадреналину в модели гиперактивации симпатической нервной системы опосредовано изменением трансляции, но не транскрипции $\alpha 1A$ -адренорецептора (Рис. 5 Е-Ж). Таким образом, мы показали, что норадреналин повышал уровень $\alpha 1A$ -адренорецепторов путем активации сигнального каскада $\beta 3$ -АР/АЦ/цАМФ/ПКА и трансляции белка рецептора, не влияя на транскрипцию мРНК.

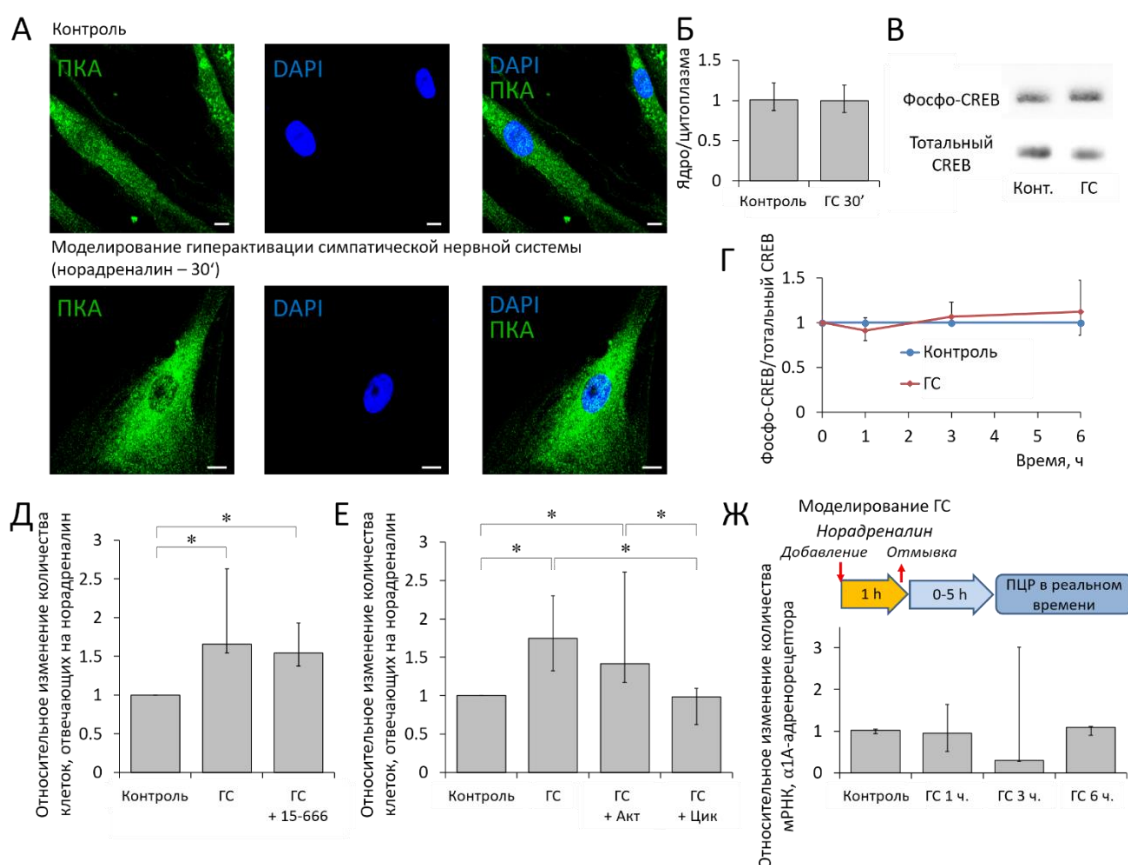


Рисунок 5. Сенситизация клеток к норадреналину опосредована изменением трансляции, но не транскрипции $\alpha 1A$ -адренорецептора. А. Репрезентативные картинки локализации протеинкиназы А в МСК при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы. Б. Соотношение иммунофлуоресценции протеинкиназы А в ядре и цитоплазме. В. Репрезентативные картинки фосфо- и тотального CREB в МСК при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). Г. Соотношение фосфо-CREB и тотального CREB в МСК при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). Д. Ингибирование CREB (15-666, 2 мкМ) не влияло на сенситизацию клеток к норадреналину. Е. Ингибирование трансляции (Циклогексимид, 90 мкМ), но не транскрипции (Актиномицин Д, 4 мкМ) приводило к снижению сенситизации клеток к норадреналину. Ж. Моделирование гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ) не влияло на уровень мРНК $\alpha 1A$ -адренорецептора. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, ГС – гиперактивация симпатической нервной системы, PKA – протеинкиназа А, DAPI – 4',6'-диамидино-2-фенилиндол, * $p < 0,05$.

Анализ транскриптома одиночных клеток при воздействии норадреналина после индуцированной сенситизации МСК. Для того чтобы выяснить, каким образом повышение норадреналин-зависимой кальциевой сигнализации влияет на функциональную активность МСК, мы проанализировали транскриптом на уровне одиночных клеток. В качестве экспериментального образца использовали клетки, дважды стимулированные норадреналином: для моделирования гиперактивации симпатической нервной системы и через 6 часов для стимуляции появившихся $\alpha 1A$ -адренорецепторов. В качестве контроля использовали клетки, претерпевшие все те же операции, но без норадреналина. Для того чтобы проанализировать изменения, которые произошли при обработке норадреналином после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, мы сравнили экспериментальный и контрольный образцы, объединив их в один массив данных, используя интеграцию (Рис. 6 А-В). В объединенном массиве выделялись 6 субпопуляций (кластеров) клеток, различающихся по функциям (Рис. 6 Г). В кластере 0 определялись клетки, в которых повышена экспрессия генов клеточного цикла (*TOP2A* (в 3,279 раз, $p < 10^{-308}$), *MKI67* (в 3,189 раз, $p < 10^{-308}$), *CENPF* (в 3,102 раз, $p < 10^{-308}$), *GTSE1* (в 2,97 раз, $p < 10^{-308}$) и *CDK1* (в 2,846 раз, $p = 5,57 \cdot 10^{-298}$)). Анализ, проведенный с помощью scVelo, показал, что клетки 0 кластера находились в S и G2-M фазах клеточного цикла (Рис. 6 Д). Таким образом, в 0 кластере находились пролиферирующие клетки. В кластере 4 определялись клетки с повышенной экспрессией генов внеклеточного матрикса (*COL16A1* (в 2,316 раз, $p = 3,05 \cdot 10^{-99}$), *LAMB2* (в 2,244 раз, $p = 1,41 \cdot 10^{-118}$), *COL6A1* (в 2,018 раз, $p = 6,91 \cdot 10^{-241}$), *COL6A2* (в 2,061 раз, $p = 3,74 \cdot 10^{-242}$), *FNI* (в 2,082 раз, $p = 3,87 \cdot 10^{-210}$), *FBLN2* (в 2,126 раз, $p = 1,17 \cdot 10^{-120}$), *COL1A1* (в 1,95 раз, $p = 8 \cdot 10^{-281}$), *COL1A2* (в 1,94 раз, $p = 1,02 \cdot 10^{-276}$)) и клеточной адгезии (*ITGB1* (в 2,846 раз, $p = 5,57 \cdot 10^{-298}$), *THBS1* (в 1,992 раз, $p = 3,08 \cdot 10^{-63}$), *THBS2* (в 2,039 раз, $p = 1,02 \cdot 10^{-148}$)). 5 кластер включал клетки, выполняющие контракильную функцию, в связи с экспрессией маркеров гладкомышечных клеток: *ACTA2* (в 5,6 раз, $p = 2,97 \cdot 10^{-57}$), *ACTG2* (в 28,95 раз, $p = 6,91 \cdot 10^{-241}$), *MYOCD* (в 2,35 раз, $p = 2,96 \cdot 10^{-9}$), *MYL9* (в 2,049 раз, $p = 3,92 \cdot 10^{-49}$), *MYH11* (в 13,825 раз, $p = 1,86 \cdot 10^{-287}$), *MYLK* (в 6,172 раз, $p = 3,76 \cdot 10^{-64}$), *TAGLN* (в 2,066 раз, $p = 3,59 \cdot 10^{-36}$), *LMOD1* (в 4,646 раз, $p = 2,41 \cdot 10^{-55}$) и *CALDI* (в 2,381 раз, $p = 1,57 \cdot 10^{-47}$). Клетки кластера 1, вероятно, активнее других синтезировали белки, так как в них была повышена экспрессия генов трансляции (*RPL27A* (в 1,319 раз, $p = 2,03 \cdot 10^{-203}$), *RPL23* (в 1,246 раз, $p = 4,75 \cdot 10^{-154}$), *RPL31* (в 1,244 раз, $p = 3,18 \cdot 10^{-95}$), *RPS27L* (в 1,235 раз, $p = 9,94 \cdot 10^{-85}$)) и метаболизма аминокислот (*GLS* (в 1,285 раз, $p = 2,08 \cdot 10^{-44}$), *SATI* (в 1,296 раз, $p = 1,25 \cdot 10^{-40}$)). Кластер 3 состоял из синтезирующих клеток с высоким уровнем аэробного метаболизма, так как в нем была повышена экспрессия генов, связанных с окислительным фосфорилированием и синтезом АТФ (*COX7A1* (в 1,46 раз, $p = 1,43 \cdot 10^{-166}$), *COX7A2* (в 1,282 раз, $p = 1,83 \cdot 10^{-126}$), *ATP5F1E* (в 1,329 раз, $p = 1,08 \cdot 10^{-232}$)), а также рибосомальные белки (*RPLA1* (в 1,337 раз, $p < 10^{-}$

³⁰⁸), *RPL28* (в 1,351 раз, $p = 4,82 \cdot 10^{-296}$), *RPS28* (в 1,34 раз, $p = 2,33 \cdot 10^{-307}$), *RPS12* (в 1,36 раз, $p < 10^{-308}$). В кластере 2 располагались фенотипически не определяемые клетки. Таким образом, по данным анализа транскриптома одиночных клеток в популяции МСК выделялись ВКМ-синтезирующие, контрактильные, пролиферирующие и синтетические субпопуляции клеток. Во всех субпопуляциях интегрированного массива данных обнаруживались клетки как контрольного, так и экспериментального образцов, однако представленность клеток каждого образца в кластерах была различна. Так, кластеры контрактильных, ВКМ-синтезирующих и синтетических клеток состояли в основном из клеток экспериментального образца. При этом кластеры 2 и 3 были представлены, в основном, клетками контрольного образца. Таким образом, при действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы происходило повышение количества контрактильных, ВКМ-синтезирующих и синтетических клеток кластера 1 и уменьшение количества клеток кластера 3. Для того чтобы определить, откуда появляются новые клетки в кластерах 0, 1, 4, 5 при воздействии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, мы воспользовались методом построения траекторий развития. Мы показали, что при воздействии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы клетки из кластера 3, состоящего в основном из клеток контроля, переходили в синтетическую субпопуляцию 1 (Рис. 6 Е).

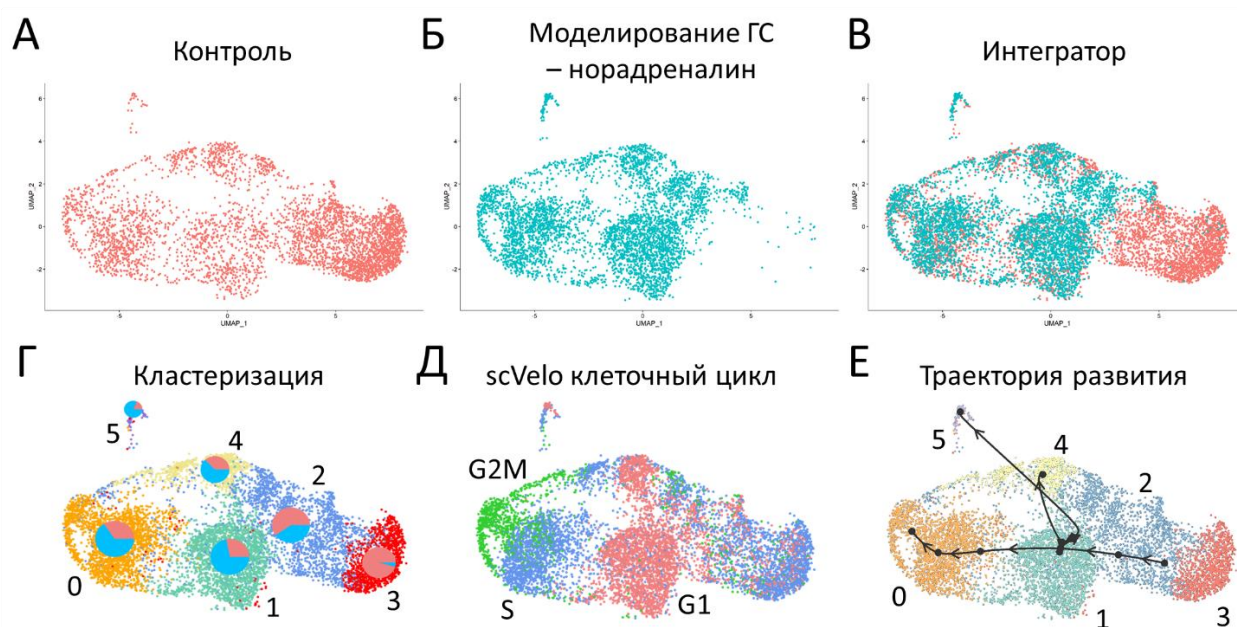


Рисунок 6. Анализ транскриптома одиночных клеток, стимулируемых норадреналином после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. Каждая точка обозначает клетку. А. Контрольные клетки. Б. Клетки, стимулированные норадреналином после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы. В. Интегратор обоих массивов данных, где похожие клетки размещены рядом, и его кластеризация (Г). Д. Оценка клеточного цикла с использованием scVelo. Е. Траектории развития на интеграторе, которые показывают движение клеток из кластеров 2, 3 в кластеры 0, 4, 5.

Для того чтобы выяснить, какие именно сократительные клетки формировались при воздействии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, мы провели интеграцию наших образцов с массивом клеток стромально-васкулярной фракции подкожной жировой ткани, предварительно отсортированных по CD45 (Hildreth et al., 2021). Предварительная сортировка позволила избавиться от большей части иммунных клеток. Мы показали, что сократительные клетки наших образцов полностью интегрировались с ГМК из стромально-васкулярной фракции (Рис. 7 А-Б). Таким образом, согласно транскриптомным данным, действие норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы приводит к переходу МСК в ГМК-подобный фенотип.

Биоинформатические алгоритмы позволяют не только определять уровень мРНК в одиночных клетках, но и оценивать активность транскрипционных факторов (алгоритм SCENIC). Так, используя SCENIC, мы оценили активность транскрипционных факторов, связанных с сократительностью, в наших образцах. Мы показали, что в экспериментальной группе клеток происходит повышение активности ключевых мастер-регуляторов сократительного фенотипа и миоцитарной дифференцировки MEF2A (в 2,16 раз, $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$), TEAD1 (в 1,78 раз, $p = 1,052 \cdot 10^{-6}$) и NFATC3 (в 1,51 раз, $p = 0,005$) (Рис. 7 В) (Mack, 2011).

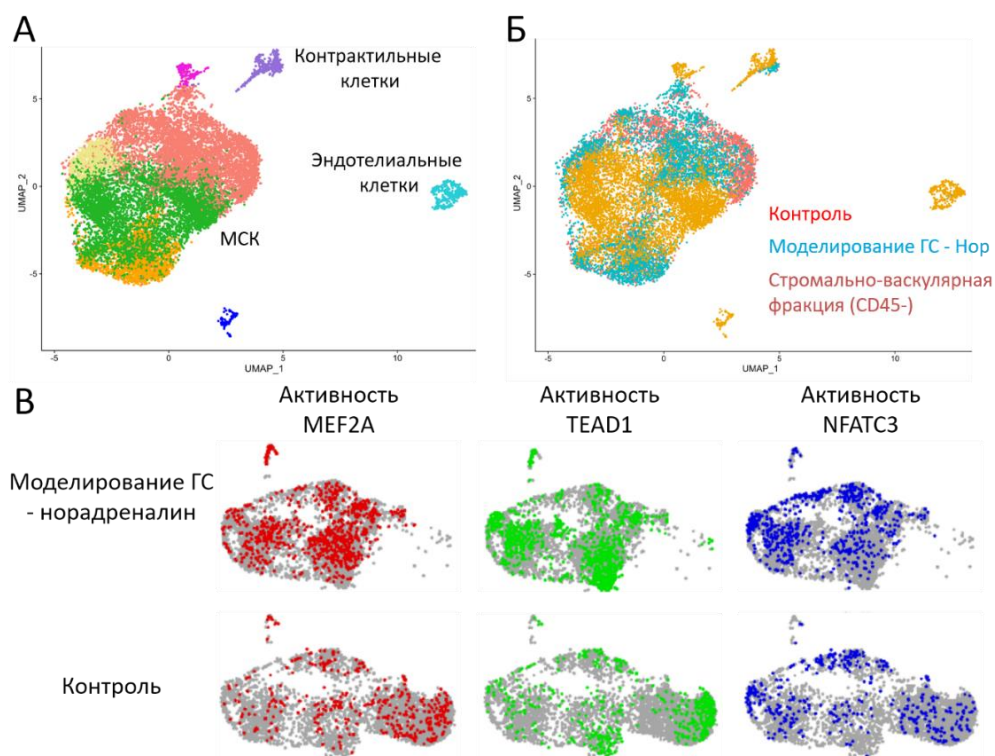


Рисунок 7. При действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы МСК переходят в ГМК-подобный фенотип. А-Б. Сократительные клетки кластера 4 по транскриптому похожи на гладкомышечные клетки (А), определяемые в стромально-васкулярной фракции (Б). В. Оценка активности транскрипционных факторов, связанных с сократительной функцией в МСК после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы и действия норадреналина. Каждая точка обозначает индивидуальную клетку.

Таким образом, из данных анализа транскриптома одиночных клеток следует, что при действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы

часть популяции МСК приобретала контрактильный фенотип. При этом во всей популяции МСК происходила активация транскрипционных факторов, связанных с контрактильностью.

Действие норадреналина на сенситизированные МСК приводило к усилению контракции МСК-коллагеновых дисков. Для того чтобы проверить, переходят ли изменения транскрипции генов, обнаруженные нами, в изменения функций клеток, мы провели функциональные тесты. С помощью модели контракции МСК-коллагеновых дисков мы проанализировали, как изменяются контрактильные свойства МСК после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы, а также после воздействия норадреналина на клетки, сенситизированные в модели гиперактивации симпатической нервной системы. Для этого мы полимеризовали коллаген в диски совместно с помещенными внутрь матрикса МСК, после чего обрабатывали клетки в соответствии с описанной выше моделью гиперактивации симпатической нервной системы. Само по себе моделирование гиперактивации симпатической нервной системы или действие норадреналина непосредственно перед запуском эксперимента не приводило к значимому усилению контракции коллагеновых дисков. При действии же норадреналина через 6 часов после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы происходило усиление контракции МСК-коллагеновых дисков на 49,23% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рис. 8 А-Б).

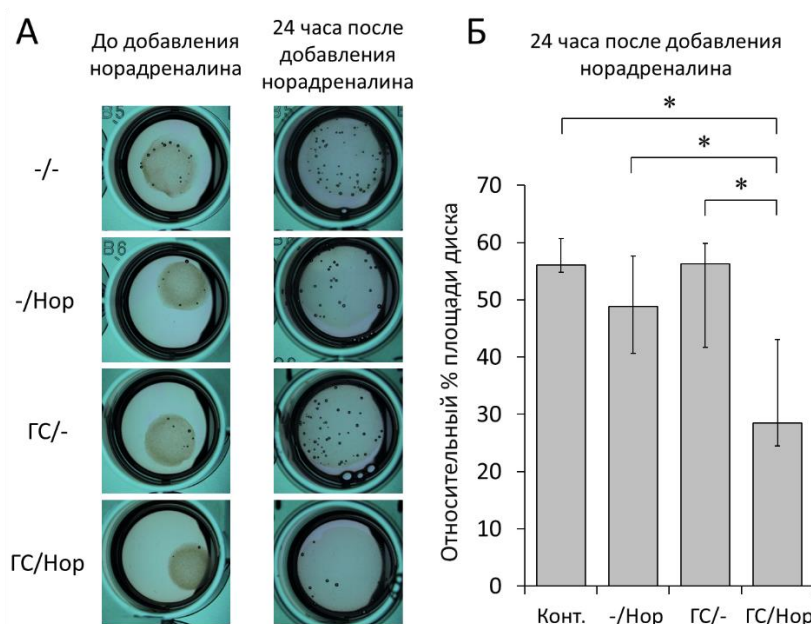


Рисунок 8. При действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы усиливалась контрактильность МСК-коллагеновых дисков. А. Репрезентативные картинки дисков до и через 24 часа после добавления норадреналина (Нор - норадреналин, 1 мкМ) и моделирования гиперактивации симпатической нервной системы (ГС - норадреналин, 1 мкМ). Б. Относительный процент площади диска через 24 часа после добавления норадреналина, ГС – гиперактивация симпатической нервной системы, * $p < 0,05$.

Анализ распределения $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах жировой ткани. Для того чтобы выяснить, имеет ли место *in vivo* описанный нами феномен приобретения контрактильного фенотипа МСК, мы обратились к ключевому сократимому компоненту жировой ткани - сосудам.

Одними из основных регуляторов контрактильности сосудов в организме человека являются $\alpha 1$ -адренорецепторы. Используя иммуногистохимический метод, мы проанализировали распределение всех изоформ $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой ткани здоровых доноров. Мы показали, что среди $\alpha 1$ -адренорецепторов в жировой ткани в целом и в сосудах в особенности преобладающей изоформой являются $\alpha 1A$. $\alpha 1B$ - и $\alpha 1D$ -адренорецепторы были представлены в жировой ткани значительно реже (Рис. 9 А-В). По умолчанию в настоящее время считается, что регуляторы контрактильности сосудов располагаются на гладкомышечных клетках. Тем не менее, согласно полученным нами данным, у здоровых доноров $\alpha 1A$ -адренорецептор локализовался на PDGFR β -экспрессирующих перицитах сосудов (в культуре они входят в популяцию МСК) (Рис. 9 А, Г-Д).

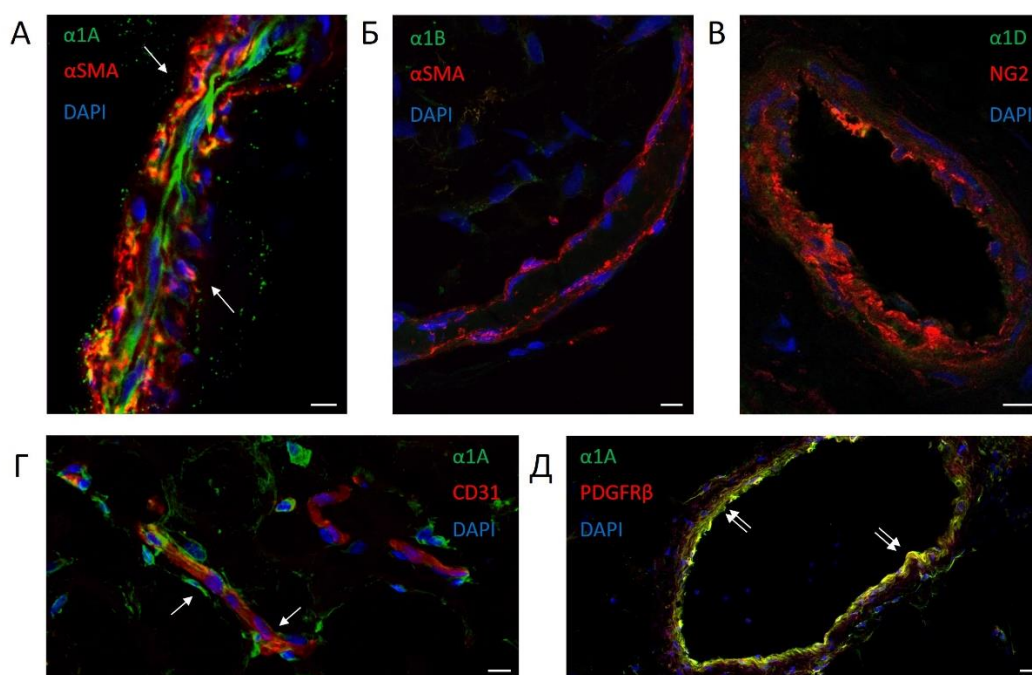


Рисунок 9. Распределение $\alpha 1$ -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки здоровых доноров. А-В. Основными $\alpha 1$ -адренорецепторами (зеленый) в сосудах подкожной жировой клетчатки здоровых доноров являлись $\alpha 1A$ -адренорецепторы. А. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) в жировой ткани здоровых доноров не экспрессируются α -SMA⁺ (красный) гладкомышечными клетками (одиночные стрелки). Г. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) в жировой ткани здоровых доноров не экспрессируются CD31⁺ (красный) эндотелиальными клетками (одиночные стрелки). Д. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) экспрессируются PDGFR β ⁺ (красный) клетками (двойные стрелки). Иммуногистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок 10 мкм.

Способность к норадреналин-зависимой сенситизации МСК коррелировала с уровнем артериального давления у пациентов с ожирением. Одним из наиболее распространенных заболеваний, ассоциированных с гиперактивацией симпатической нервной системы, является ожирение (Grassi et al., 2019). Гиперактивация симпатической нервной системы развивается в 95-100% случаев ожирения. При этом, связанное с этим усиление контрактильности сосудов и, следовательно, стабильное повышение артериального давления наблюдается не у всех пациентов с ожирением и гиперактивацией симпатической нервной системы (Kotchen, 2010). Мы предположили, что обнаруженный нами механизм сенситизации

МСК к норадреналину является звеном, соединяющим гиперактивацию симпатической нервной системы и развитие артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. Для того чтобы проанализировать наличие связи между способностью МСК к изменению чувствительности к норадреналину и уровнем АД, мы набрали 2 группы пациентов, страдающих ожирением. В первую группу мы отобрали 5 пациентов с ожирением и без артериальной гипертензии. Во вторую группу - 5 пациентов с ожирением и установленной артериальной гипертензией. Другими заболеваниями, в том числе аллергическими, данные пациенты не страдали. Основные биохимические показатели у данных пациентов были в пределах референсных значений. Ожирение определяли как ИМТ $> 30 \text{ кг/м}^2$ (Российская ассоциация эндокринологов, 2020). Артериальную гипертензию определяли как систолическое АД $> 140 \text{ мм рт.ст.}$ и/или диастолическое АД $> 90 \text{ мм рт.ст.}$ в покое (Williams et al., 2018). Мы выделили МСК из подкожной жировой ткани и проанализировали их способность к сенситизации в модели гиперактивации симпатической нервной системы. Как показано на Рис. 10, клетки пациентов с ожирением и артериальной гипертензией обладали выраженной способностью сенситизироваться к норадреналину при моделировании гиперактивации симпатической нервной системы (в 1.88 раз [1,50, 1,93]). При этом у пациентов с ожирением без артериальной гипертензии клетки не сенситизировались (в 1.043 раза [0,96, 1,18]). Таким образом, только МСК пациентов с ожирением, страдающих артериальной гипертензией, были способны повышать чувствительность к норадреналину после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы (в 1,81 раза, $p = 0,008$).

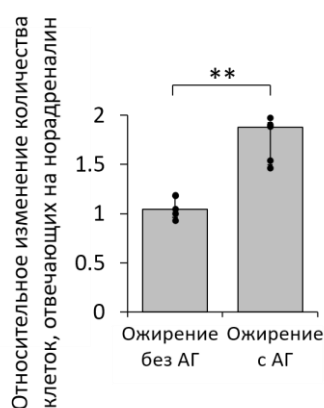


Рисунок 10. Степень сенситизации МСК к норадреналину у пациентов с ожирением с/без артериальной гипертензией. ** $p < 0,01$.

Анализ распределения $\alpha 1A$ -адренорецепторов в жировой ткани пациентов с ожирением, страдающих и не страдающих артериальной гипертензией. При действии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на МСК происходит переход клеток в ГМК-подобный фенотип. А основными $\alpha 1$ -адренорецепторами сосудов жировой ткани человека являются $\alpha 1A$ -адренорецепторы. Мы проанализировали

распределение $\alpha 1A$ -адренорецепторов у пациентов с ожирением и артериальной гипертензией, клетки которых сенситизировались к норадреналину, и пациентов с ожирением без артериальной гипертензии, которые не сенситизировались к норадреналину. Используя иммуногистохимическую окраску, мы показали, что у пациентов с ожирением без артериальной гипертензии $\alpha 1A$ -адренорецепторы экспрессировались также только на PDGFR β ⁺ МСК (Рис. 11 А-В, 3).

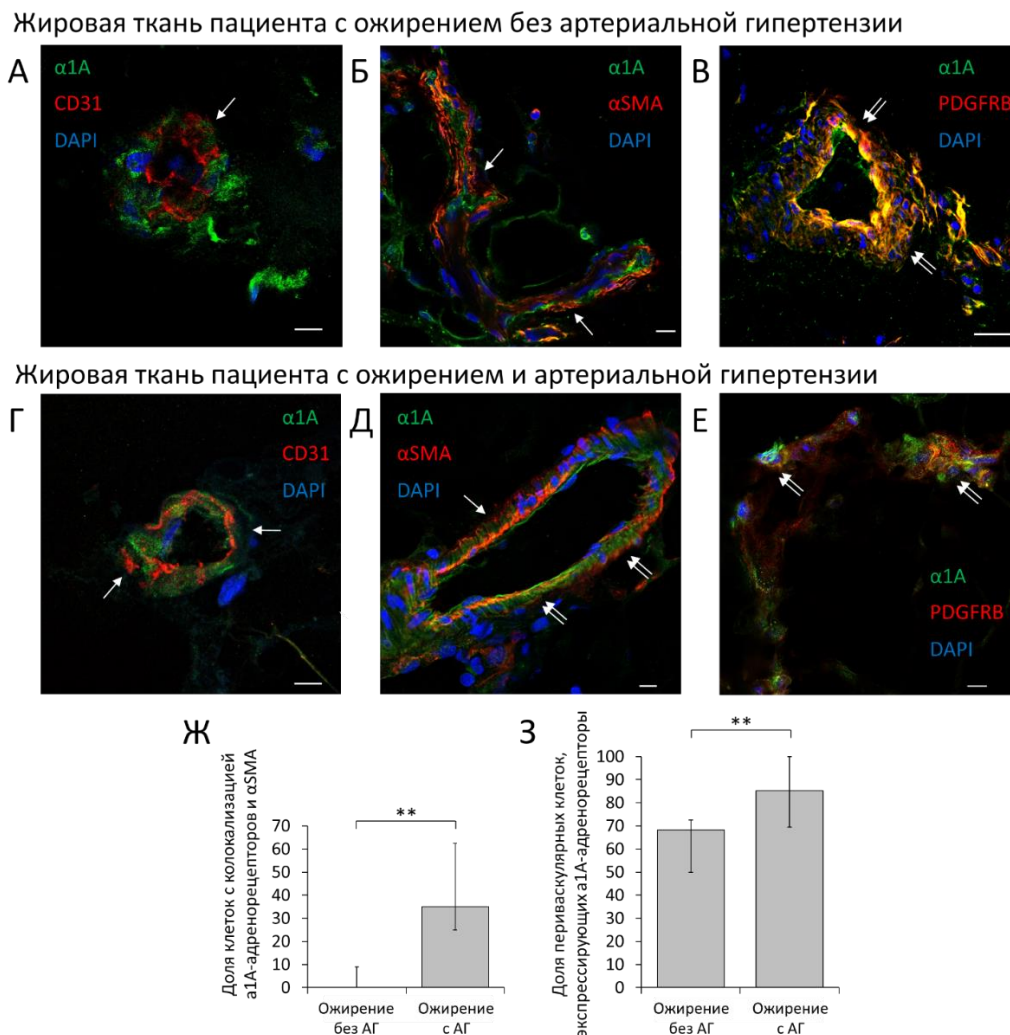


Рисунок 11. Распределение $\alpha 1A$ -адренорецепторов в сосудах подкожной жировой клетчатки пациентов с ожирением. А-В. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) в жировой ткани пациентов с ожирением без артериальной гипертензии экспрессируются мезенхимными стромальными клетками (красный - PDGFR β). Г-Е. $\alpha 1A$ -адренорецепторы (зеленый) в жировой ткани пациентов с ожирением без артериальной гипертензии экспрессируются мезенхимными стромальными (красный - PDGFR β) и α -SMA⁺ клетками (красный - α -SMA). Иммуногистохимическое окрашивание, конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок 10 мкм.

Однако у пациентов с ожирением и повышенным артериальным давлением $\alpha 1A$ -адренорецепторы обнаруживались и на 35% α -SMA⁺ клеток ($p = 0,001$) (Рис. 11 Г-Ж). В целом, в сосудах пациентов с ожирением и артериальной гипертензией экспрессия $\alpha 1A$ -адренорецепторов была повышена на 24,74% ($p = 0,009$) по сравнению с пациентами, страдающими ожирением без артериальной гипертензии (Рис. 11 Ж). Вероятно, гиперактивация симпатической нервной

системы при ожирении приводила к усилению чувствительности МСК к норадреналину и ассоциированному с этим переходу клеток в ГМК-подобный фенотип.

Заключение

Общая модель повышения контрактильности сосудов при развитии гиперактивации симпатической нервной системы, ассоциированной с ожирением. На основании полученных нами данных можно предположить следующий патологический механизм, развивающийся у пациентов с ожирением и приводящий к артериальной гипертензии, ассоциированной с ожирением. Ожирение индуцирует повышенный уровень активности симпатической нервной системы, что увеличивает уровень норадреналина в жировой ткани. Норадреналин действует на β_3 -адренорецепторы МСК/перицитов сосудов и повышает в них экспрессию α_1A -адренорецепторов. Повышение уровня α_1A -адренорецепторов сопровождается усилением контрактильности МСК и, вероятно, к переходу клеток в ГМК-подобный фенотип. Повышение контрактильности клеток приводит к усилению вазоконстрикции сосудов и повышению общего периферического сосудистого сопротивления, что приводит к развитию артериальной гипертензии у пациентов с ожирением (Рис. 12).



Рисунок 12. Механизм вероятного участия МСК в развитии артериальной гипертензии у пациентов с ожирением. АР – адренорецептор, АЦ – аденилатциклаза, цАМФ – циклический аденозинмонофосфат, PKA – протеинкиназа А.

Выводы

1. Норадреналин повышает количество белка $\alpha 1A$ -адренорецепторов в 2,22 раза ($p = 3.896 \cdot 10^{-7}$) в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках путем активации сигнального каскада $\beta 3$ -АР/АЦ/цАМФ/ПКА, повышения трансляции молекул рецептора, но не влияет на транскрипцию его мРНК.
2. При воздействии норадреналина после моделирования гиперактивации симпатической нервной системы на уровне одиночных клеток происходит увеличение количества клеток с фенотипом гладкомышечных в 4,0 раза. Также во всей популяции в 1,5-2 раза ($p < 0,01$) усиливается активность транскрипционных факторов, ассоциированных с дифференцировкой мультипотентных стромальных клеток в гладкомышечные клетки.
3. Моделирование гиперактивации симпатической нервной системы приводит к 49,23% усилению ($p < 0,05$) влияния норадреналина на контрактильность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток.
4. При моделировании гиперактивации симпатической нервной системы количество отвечающих на норадреналин кальциевой сигнализацией мультипотентных мезенхимных стромальных клеток у пациентов с ожирением, страдающих от артериальной гипертензии, в 1,81 раза ($p = 0,008$) больше, чем у пациентов с ожирением без артериальной гипертензии.
5. В жировой ткани пациентов с ожирением без артериальной гипертензии $\alpha 1A$ -адренорецепторы экспрессируются на перицитах (мультипотентных мезенхимных стромальных клетках). У пациентов с ожирением и сопутствующей артериальной гипертензией $\alpha 1A$ -адренорецепторы экспрессируются также на 35,0% гладкомышечных клеток ($p = 0,001$).

**Научные статьи по теме диссертации,
опубликованные в журналах SCOPUS, WOS, RSCI**

1. Тюрин-Кузьмин П. А., Молчанов А. Ю., Чечехин В. И. и др. Метаболическая регуляция дифференцировки стволовых клеток млекопитающих // Биохимия. – 2020. – Том 85. № 3. С. 307–323.
2. Хозяинова А. А., Валяева А. А., Арбатский М. С. и др. Возможности комплексного анализа данных секвенирования РНК единичных клеток // Биохимия. – 2023. – Том 88, № 2. – С.171–198.
3. Чечехин В. И., Кулебякин К. Ю., Тюрин-Кузьмин П. А. Особенности регуляции гормональной чувствительности стволовых клеток // Онтогенез. – 2022. – Том 53, № 3. – С.163–172.
4. Arbatsky M., Tyurin-Kuzmin P., Kulebyakin K. et al. Points of Significance: Principal Component Analysis for Biocentric Data Visualization // BioNanoScience. – 2022. – Vol. 12. – P.1366–1380.
5. Chechekhin V., Ivanova A., Kulebyakin K. et al. Alpha1A-and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension // Cells. – 2023. – Vol. 12, N 585. – P.1–14.
6. Chechekhin V., Kulebyakin K., Kokaev R., Tyurin-Kuzmin P. GPCRs in the regulation of the functional activity of multipotent mesenchymal stromal cells // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2022. – Vol. 10. – P.953374.
7. Tyurin-Kuzmin P., Chechekhin V., Ivanova A. et al. Noradrenaline Sensitivity Is Severely Impaired in Immortalized Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Line // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19, N 12. – P.3712.
8. Tyurin-Kuzmin P., Karagyaur M., Kulebyakin K. et al. Functional heterogeneity of protein kinase a activation in multipotent stromal cells // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, N 12. – P.4442.