

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Агеева Людмила Владимировна

РЕЦЕПТОРЫ АНГИОТЕНЗИНА II В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И
СЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК
ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

03.01.04 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н., доцент
Наталья Игоревна Калинина

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Жировая ткань. Структура и функционирование.....	12
1.1.1 Виды жировой ткани	12
1.1.2 Обновление жировой ткани	14
1.2 Мезенхимные стромальные клетки.....	18
1.2.1 История изучения и общие свойства	18
1.2.2 Участие МСК в регенерации тканей.....	21
1.3 Ренин-ангиотензиновая система.....	23
1.3.1 Классическое представление. Циркулирующая РАС	23
1.3.2 Рецепторы к Ang II. Строение и сигнализация.....	26
1.3.3 Локальные РАС. Влияние на метаболизм жировой ткани	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Выделение МСК из жировой ткани человека	37
2.2 Культивирование клеток	37
2.3 Иммунофлуоресцентное окрашивание ангиотензиновых рецепторов	38
in situ в жировой ткани и in vitro в культуре МСК	38
2.4 Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток	39
2.5 Ca ²⁺ -imaging	40
2.6 Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР (ОТ-ПЦР).....	41
2.7 Адипогенная дифференцировка	43
2.8 Обработка МСК Ang II и ингибиторами к компонентам РАС.....	44
2.9 Определение нейротрофической активности МСК.....	45
2.10 Получение кондиционированной среды МСК для протеомного анализа секретируемых факторов.....	46
2.11 Статистический обработка данных	46
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	47
3.1 Экспрессия локальной РАС в МСК жировой ткани человека in vivo и in vitro	47

3.2 Влияние Ang II на адипогенную дифференцировку МСК жировой ткани....	60
3.3 Влияние Ang II на секреторную активность МСК жировой ткани	65
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	72
ВЫВОДЫ	73
СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	74
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	76
БЛАГОДАРНОСТИ	95

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Adipoq –адипонектин

AGT – ангиотензиноген

Ang 1-7 – ангиотензин 1-7

Ang I – ангиотензин I

Ang II – ангиотензин II

ARTN – артемин

AT1 – рецептор первого типа к Ang II

AT2 – рецептор второго типа к Ang II

ATBP50 – белок массой 50кДа, связывающий AT2-рецептор

ATIP1 – белок, взаимодействующий с AT2-рецептором

BDNF – нейротрофический фактор мозга

C/EBP – связывающиеся с энхансером ССААТ белки

DAPI – 4',6-диамино-2-фенилиндол

DMEM –модифицированная Дульбекко среда Игла

ERK1/2 – внеклеточные сигнал-активируемые киназы 1 или 2

FACS – метод сортировки клеток с активированной флуоресценцией

FAS – ген синтазы жирных кислот

FBS – фетальная бычья сыворотка

FGF2 – основной фактор роста фибробластов 2

GDNF – глиальный нейротрофический фактор

GPCR(s) – G-белок ассоциированный рецептор(ы)

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста

JAK-киназа – Янус-киназа

Klf5 – Круппель-подобный фактор 5

MAP-киназа – митоген-активируемая протеинкиназа

MAS1 – рецептор к Ang 1-7

MCP-1 – моноцитарный хемотаксический фактор 1

MrgD – рецептор к аламандину

Myf5 – миогенный фактор 5

NGF – фактор роста нервов

NRG1 – нейрегулин 1

NRTN – нейртурин

NTF3 – нейротрофин-3

PBS - натрий-фосфатный буфер

PDGFR β – β рецептор к фактору роста тромбоцитов

PEDF – фактор роста пигментного эпителия

PKC – протеинкиназа C

PLZF – промиелотический белок из группы белков с цинковыми пальцами

PPAR γ – гамма рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором

PRCP – пролилкарбоксипептидаза / ангиотензиназа C

REN –ренин

RPL13A – рибосомальный белок L13a

Sca-1 – антиген стволовых клеток 1

STAT-белок – сигнальный белок и активатор транскрипции

TGFA – трансформирующий фактор роста альфа

TNF α – фактор некроза опухоли α

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

АПФ/ACE – ангиотензинпревращающий фермент, angiotensin-converting enzyme

АПФ2 – ангиотензинпревращающий фермент 2

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДАГ – диацилглицерин

ЖТ – жировая ткань

МСК – мезенхимные стромальные клетки

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

РАС – ренин-ангиотензиновая система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

По современным представлениям жировая ткань является не только депо дополнительной энергии, но и выполняет функцию эндокринной железы, продуцируя гормоны, которые регулируют пищевое поведение, метаболизм, репродуктивную функцию и иммунитет. Как избыточный рост жировой ткани, так и ее критический дефицит, являются факторами риска сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, диабета и метаболического синдрома [1]. Обновление жировой ткани в норме и ее ремоделирование при патологии происходят за счет дифференцировки и секреторной активности прогениторных клеток, которые располагаются в строме жировой ткани, включая стенку кровеносных сосудов. Для обозначения таких клеток был предложен целый ряд разных терминов, в том числе и мезенхимные стромальные клетки (МСК), который использован в данной работе.

Анализ МСК, выделенных из жировой ткани в составе стромально-васкулярной фракции, показал, что эти клетки обладают выраженной функциональной гетерогенностью. Так, МСК сходного иммунофенотипа и морфологии могут значительно различаться по скорости пролиферации, способности к адипогенной дифференцировке и по секреторной активности. В ряде исследований показано, что только отдельные субпопуляции МСК являются источником преадипоцитов [2]. Но факторы, регулирующие активность МСК, и задействованные в этом механизмы до сих пор до конца не установлены и активно изучаются. Учитывая выраженную эндокринную активность жировой ткани, важную роль в функционировании МСК могут играть гормоны. Однако гормональная регуляция МСК еще практически не изучена.

В нашей лаборатории было показано, что МСК жировой ткани экспрессируют рецепторы ко многим гормонам, включая рецепторы к ангиотензину II (Ang II). Это пептидный гормон ренин-ангиотензиновой системы (РАС), которая долгое время описывалась как циркулирующая эндокринная

система, регулирующая кровяное давление и электролитный баланс в организме. Согласно классическим представлениям, Ang II в крови образуется в результате протеолитического каскада: ангиотензиноген, продуцирующийся печенью, расщепляется синтезирующимся в почках ренином до ангиотензина I (Ang I), который затем расщепляется до Ang II ангиотензинпревращающим ферментом (АПФ), экспрессированным на эндотелии лёгких. Ang II связывается с двумя типами рецепторов, которые принадлежат к семейству семидоменных рецепторов, сопряженных с G-белками. Связывание Ang II с AT1-рецептором вызывает активацию $G\alpha_q/11$ субъединицы, что приводит к активации фосфолипазы C. В результате происходит образование инозитол (1,4,5)-трисфосфата, стимулирующего выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо в цитоплазму, а также диацилглицерина (ДАГ), активирующего протеинкиназу C. Помимо этих путей внутриклеточной сигнализации, связывание Ang II с AT1-рецептором может активировать такие $G\alpha$ -субъединицы как $G_{12/13}$ и G_i , димер $G\beta\gamma$, а также пути, опосредованные β -аррестинами. AT1-рецептор содержится в большинстве типов клеток взрослого организма, тогда как AT2-рецептор был обнаружен лишь на ограниченном числе клеток жировой ткани, головного мозга, почек, сердца и органов репродуктивной системы. В отличие от AT1-рецептора, внутриклеточные сигнальные каскады, активируемые AT2-рецептором, остаются мало изученными. Ang I и Ang II могут подвергаться дальнейшему расщеплению с образованием таких биологически активных пептидов, как Ang 1-7 и аламандин, которые взаимодействуют со своими специфическими рецепторами MAS1 и MrgD. Согласно данным нескольких исследовательских групп, активация AT2-рецептора, а также MAS1 и MrgD, вызывает эффекты, противоположные тем, к которым приводит взаимодействие Ang II с AT1-рецептором [3].

Помимо циркулирующей РАС, в головном мозге, почках, стенке кровеносных сосудов, сердце, костной и жировой ткани была обнаружена продукция ангиотензиногена и процессирующих его ферментов: так называемая «тканевая» или «локальная» РАС [4]. Оказалось, что локальная РАС участвует в поддержании гомеостаза тканей и их регенерации после повреждения [5]. Более

того, была выявлена корреляция активности РАС и развития ожирения, а взаимодействие Ang II с AT1-рецептором приводит к подавлению адипогенной дифференцировки [6]. Эти данные позволили предположить, что Ang II может регулировать функциональную активность МСК жировой ткани человека посредством взаимодействия с AT1 и AT2-рецепторами.

Цель и задачи работы

Целью данной работы было изучение влияния ангиотензина II на функциональную активность МСК жировой ткани человека. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать экспрессию компонентов ренин-ангиотензиновой системы и функциональную активность рецепторов к ангиотензину II в МСК жировой ткани человека
2. Проанализировать участие рецепторов ангиотензина II в регуляции адипогенной дифференцировки МСК жировой ткани человека
3. Установить механизм влияния ангиотензина II на секреторную активность МСК жировой ткани человека

Научная новизна

1. Впервые проведено подробное исследование компонентов РАС в МСК ЖТ человека и обнаружена гетерогенность в экспрессии и функционировании рецепторов к ангиотензиновым пептидам.
2. Впервые обнаружено влияние локального Ang II на адипогенную дифференцировку отдельных субпопуляций МСК ЖТ.
3. Впервые показано активирующее влияние Ang II на нейротрофическую активность МСК ЖТ.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты представленной работы подтверждают важную роль гормональной регуляции в функционировании МСК ЖТ. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация РАС при патологиях жировой ткани может влиять не только на метаболизм самой ткани, но и на ее эндокринные функции. Последующие исследования гормональной регуляции МСК ЖТ будут способствовать пониманию механизмов развития ожирения, сердечно-сосудистых заболеваний, диабета и метаболического синдрома.

Методология и методы исследования

В работе использовали образцы подкожной жировой ткани человека, из которых выделяли первичные культуры МСК. Функциональность AT1-рецепторов к Ang II определяли с помощью метода Ca^{2+} -imaging на единичных клетках. Субпопуляции МСК выделяли с помощью клеточного сортера методом FACS. Адипогенную дифференцировку МСК проводили с помощью дифференцировочного коктейля, а затем оценивали по мРНК маркеров адипогенеза и окрашиванию масляным красным О. Нейротрофическую активность кондиционированной среды от МСК определяли с помощью модели роста нейритов в клетках мышечной нейробластомы линии Neuro2A. Экспрессию компонентов ренин-ангиотензиновой системы оценивали с помощью иммуногистохимического и иммуноцитохимического окрашиваний, а также проточной цитофлуориметрии. Для характеристики экспрессии мРНК компонентов РАС, маркеров адипогенеза и нейротрофических факторов использовали метод количественного ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции. Для определения влияния Ang II на функционирование МСК использовали Ang II, ингибитор АПФ эналаприлат, ингибитор AT1-рецепторов лозартан и ингибитор AT2-рецепторов PD123319 в различных комбинациях. Белки и пептиды, секретируемые МСК, анализировали с помощью методов жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. МСК жировой ткани содержат функционально-активную локальную ренин-ангиотензиновую систему.
2. МСК жировой ткани гетерогенны по экспрессии рецепторов к ангиотензиновым пептидам и по механизмам проведения сигналов от них.
3. Ang II ингибирует адипогенную дифференцировку МСК жировой ткани через AT1-рецептор и активирует через AT2-рецептор. Действие локального Ang II через AT2-рецептор приводит к увеличению адипогенного потенциала небольшой субпопуляции МСК жировой ткани, которая обогащена рецепторами к ангиотензиновым пептидам и содержит стабильно экспонированный на поверхности AT1-рецептор.
4. Ang II стимулирует нейротрофическую активность МСК жировой ткани через AT2-рецептор.

Личный вклад автора в проведённое исследование заключается в сборе и анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов (включая получение первичных культур, культивирование клеток, проточную цитофлуориметрию, подготовку клеток к сортировке и кондиционированной среды к протеомному анализу, анализ экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР, определение концентрации кальция, проведение адипогенной дифференцировки, определение нейротрофической активности, обработку клеток гормонами и ингибиторами), анализе и оформлении полученных результатов, представлении результатов на научных мероприятиях и подготовке публикаций в научные журналы.

Степень достоверности и апробация работы

Результаты были представлены на следующих научных мероприятиях: V Всероссийская научно-практическая конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина», 2013; ISSCR 2015 Annual Meeting, 2015; II Национальный конгресс по регенеративной медицине, 2015; Cell technologies at the edge: research & practice, 2016, обсуждались на семинарах кафедры биохимии и

молекулярной медицины ФФМ МГУ в 2012-2019 гг. Основные результаты работы были опубликованы в рецензируемых зарубежных и российских научных журналах.

Сведения о публикациях по теме диссертации

Результаты исследований опубликованы в 8 печатных работах, из них: 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, 2 статьи в других журналах и 3 публикации в материалах международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка научных работ, благодарностей и списка литературы, состоящего из 234 источников. Диссертация изложена на 95 страницах, содержит 21 рисунок и 1 таблицу.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Жировая ткань. Структура и функционирование

1.1.1 Виды жировой ткани

Жировая ткань – весьма сложный орган, который, однако, долгое время рассматривали исключительно как соединительную ткань, запасующую дополнительную энергию в виде липидов. И только после открытия таких гормонов, продуцируемых жировой тканью, как лептин и адипсин, стало понятно, что жировая ткань является важным эндокринным органом, который влияет на общий гомеостаз организма [1; 7].

У млекопитающих существует два типа жировой ткани: белая и бурая [1; 8]. Клетки бурой жировой ткани запасают энергию в виде множества небольших липидных капель. Они обогащены митохондриями, имеют термогенин и в основном функционируют, превращая запасенную энергию в тепло. Ранее считалось, что бурая жировая ткань в организме взрослого человека сильно редуцируется и присутствует преимущественно в межлопаточной области, активно функционируя только в случае частого холодового воздействия. Однако недавние исследования показали, что бурые адипоциты и адипоциты, выполняющие функции и бурых, и белых – т.н. «бежевые» - расположены не только в специализированных депо и их представленность в организме гораздо шире [9]. Кроме того, было выявлено множество факторов, активирующих термогенез, способствуя обратимому превращению белых адипоцитов в бежевые: катехоламины, трийодтиронин, натрийуретические пептиды, гормон мышечной ткани ирисин [10–14]. Формирование и значение бурых и бежевых адипоцитов до сих пор является предметом дискуссии, однако по последним данным они образуются из разных предшественников. Так, бурые адипоциты имеют общего предшественника с мышечными клетками и характеризуются экспрессией факторов транскрипции Pax7 и Myf5 [15]. А бежевые адипоциты образуются только из белых, характеризуются наличием маркеров CD29, CD34, Sca-1, CD24 и имеют общих предшественников с клетками сосудистой стенки [16].

Преобладающим видом жировой ткани в организме млекопитающих и человека является белая жировая ткань, которая расположена в организме в двух основных депо: в подкожных и в висцеральных (жир сальника, брыжейки, забрюшинный, гонадный, перикардальный и т.п.) [17]. Белая жировая ткань состоит из адипоцитов, которые содержат одну жировую каплю, которая может занимать до 90% цитоплазмы клетки [1]. Основная роль белых адипоцитов – запас избытка энергии, поступающей с пищей, в виде триглицеридов. Белая жировая ткань формируется в конце эмбрионального и в раннем постнатальном развитии и способна изменяться в размерах в течение всей жизни, в зависимости от баланса поступающей и расходуемой энергии [18]. Запасание липидов может происходить в белой жировой ткани различными способами: при отщеплении триглицеридов специфическими липазами от липопротеинов, при синтезе триглицеридов из жирных кислот или же в результате липогенеза из других нелипидных субстратов. При отрицательном балансе энергии в организме происходит мобилизация запасенных жиров и расщепление их липазами жировой ткани до жирных кислот, которые поступают в кровоток и метаболизируются в других органах [19].

Избыточная масса тела и ожирение связаны с чрезмерным формированием именно белой жировой ткани. При избытке калорий сначала развивается гипертрофия адипоцитов: нарастание их объема за счет усиленного накопления липидов. При более тяжелых формах ожирения может происходить развитие гиперплазии жировой ткани: увеличение количества адипоцитов. При этом одновременно возрастает доля гибнущих адипоцитов, т.е. гиперплазия обеспечивается за счет усиленной пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток [20; 21]. Кроме того, при ожирении изменяется секреторная функция жировой ткани, что может приводить к развитию сопутствующих заболеваний: ишемической болезни сердца, атеросклероза, диабета 2-го типа [1]. Поэтому в связи с широким распространением проблемы ожирения в современном обществе, изучение механизмов обновления жировой ткани является особенно актуальным вопросом.

1.1.2 Обновление жировой ткани

Адипогенная дифференцировка

Адиipoциты составляют не более трети всего числа клеток жировой ткани, однако их объем при этом может занимать до 80% всего объема ткани. Помимо адипоцитов жировая ткань содержит кровеносные сосуды, нервные волокна, фибробласты, макрофаги и предшественники адипоцитов на разных стадиях дифференцировки. Процесс формирования новых адипоцитов можно разделить на два этапа: коммитирование мультипотентных предшественников в адипоцитарном направлении и терминальная дифференцировка. В процессе коммитирования происходит запуск программы адипоцитарной дифференцировки, и клетка становится преадипоцитом. Далее происходит терминальная дифференцировка: превращение преадипоцита в зрелый адипоцит [1].

Основные модели по изучению адипогенеза - это различные линии уже коммитированных предшественников, поэтому гораздо больше сведений накоплено о терминальной дифференцировке преадипоцитов, чем об их коммитировании [22]. Для активации дифференцировки преадипоцитов жировой ткани *in vitro* необходимо три основных фактора: инсулин (или инсулиноподобный фактор роста, *insulin-like growth factor 1*, IGF-1), глюкокортикоид и ингибитор цАМФ-фосфодиэстеразы. Именно сочетание этих факторов обычно используют для индукции дифференцировки клеток *in vitro* [23; 24]. Инсулин связывается с инсулиновым рецептором и рецептором IGF-1, которые экспрессированы на поверхности преадипоцитов. Для активации сигнального пути рецептора глюкокортикоидов чаще всего используют дексаметазон, а из ингибиторов цАМФ-фосфодиэстеразы — изобутилметилксантин, повышающий концентрацию цАМФ и активирующий цАМФ-зависимые протеинкиназы [25]. После индукции дифференцировки преадипоциты проходят завершающую стадию митоза и входят в фазу блокировки роста, а затем активируются поздние гены дифференцировки,

необходимые для формирования липидных капель [26]. Вероятно, заключительный митоз (клональная экспансия) необходим для того, чтобы регуляторные элементы поздних генов были доступны для связывания с транскрипционными факторами [27].

На сегодняшний день выявлено порядка двадцати различных транскрипционных факторов, участвующих в адипогенезе. Однако лишь часть из них специфична именно для адипогенеза и стала маркерами дифференцировки. В рамках данной работы обсудим некоторые наиболее важные маркеры, для которых выявлена четкая взаимосвязь и последовательность участия в адипогенезе.

Центральный регулятор запуска адипогенеза – транскрипционный фактор PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, гамма рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором). PPAR γ имеет две изоформы: PPAR γ 1 и PPAR γ 2, причем изоформа PPAR γ 2 экспрессируется исключительно в жировой ткани [28]. При активации PPAR γ лигандом запускается полная программа дифференцировки, связанная с изменением морфологии клеток, запасанием липидов и экспрессией других генов, активных в адипоцитах. Даже клетки неадипогенных линий, такие как фибробласты и миобласты, при активации PPAR γ превращаются в адипоциты. А некоторые мутации в гене PPAR γ приводят к липодистрофии и выраженной инсулинорезистентности [29; 30].

Одними из наиболее ранних факторов транскрипции, которые активируются при индукции адипогенной дифференцировки, являются белки семейства C/EBP (связывающиеся с энхансером ССААТ белки, ССААТ/enhancer binding proteins): C/EBP β и C/EBP δ (рис. 1). Экспрессия C/EBP β индуцируется при повышении внутриклеточного цАМФ за счет изобутилметилксантина и при связывании инсулина с рецептором, а C/EBP δ активируется глюкокортикоидами. Показано, что именно C/EBP β вовлечен в клональную экспансию преадипоцитов [31].

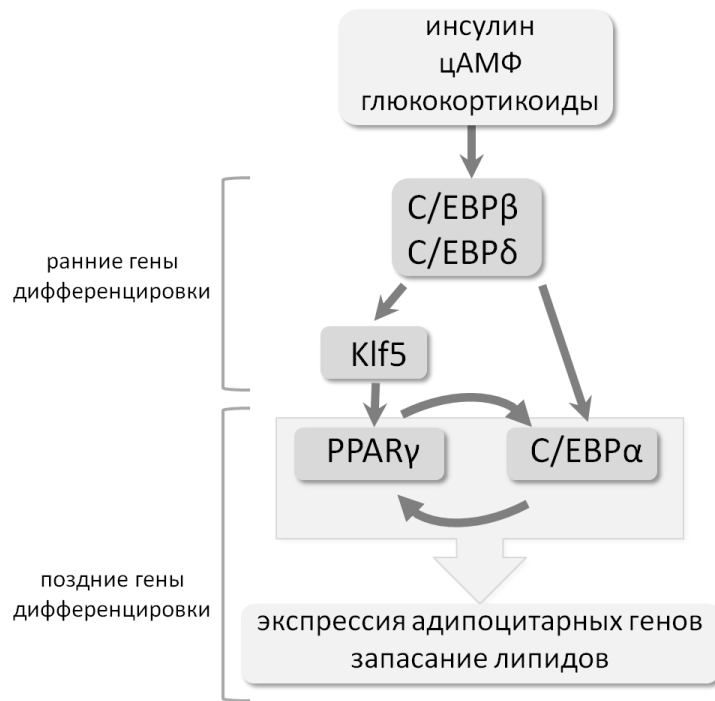


Рисунок 1. Каскад активации транскрипционных факторов при дифференцировке преадипоцитов.

На следующей стадии дифференцировки C/EBP β и C/EBP δ активируют экспрессию PPAR γ , а также другого белка семейства C/EBP: C/EBP α [32]. При этом индукция адипоцит-специфического PPAR γ 2 происходит через активацию белками C/EBP β и C/EBP δ транскрипционного фактора Klf5, который затем связывается с промотором гена PPAR γ 2 [33]. Кроме того, C/EBP α и PPAR γ также взаимно индуцируют экспрессию друг друга, связываясь с регуляторными элементами соответствующих генов PPARG и CEBPA (рис. 1) [34]. Необратимость активации C/EBP α и PPAR γ обеспечивается положительной обратной связью: за счет влияния PPAR γ на C/EBP β и инсулиновый рецептор [35]. Далее C/EBP α и PPAR γ уже напрямую контролируют экспрессию адипоцит-специфических генов, таких как адипонектин (Adipoq) и синтаза жирных кислот (fatty acid synthase, FAS), и активируют накопление липидов в липидной капле [34].

Секреторные функции жировой ткани

Изучение эндокринной функции жировой ткани привело к пониманию того, что эта ткань является важным регулятором метаболизма всего организма, а не только баланса липидов [7]. И в первую очередь – метаболизма глюкозы. Важность эндокринной функции жировой ткани подтверждается развитием инсулинорезистентности и гипергликемии при ожирении или наоборот при липодистрофии [18; 36]. Гормоны жировой ткани, называемые адипокинами, влияют на эндокринные железы, включая надпочечники, гипоталамо-гипофизарную систему, поджелудочную, щитовидную и половые железы, гормоны которых в свою очередь, регулируют пищевое поведение и адипогенез [37].

Среди адипокинов наиболее изученными являются лептин и адипонектин. Лептин секретируется преимущественно адипоцитами и играет важную роль в активации метаболизма глюкозы и чувствительности к инсулину в клетках мышечной ткани. Кроме того, лептин вызывает чувство насыщения за счет влияния на высвобождение медиатора голода – нейрпептида Y [7]. Лептин также напрямую способен влиять на дифференцировку предшественников адипоцитов. Так, с помощью антисмысловых мРНК и на моделях трансгенных мышей было показано, что лептин ингибирует адипогенез [38; 39].

Адипонектин экспрессируется только в зрелых адипоцитах и в виде различных мультимеров присутствует в крови, причем в весьма высокой концентрации: 5-10 мкг/мл. Но в противоположность многим другим адипокинам экспрессия адипонектина обратно пропорциональна массе тела и снижается при ожирении [40]. Адипонектин также влияет на метаболизм глюкозы и липидов, а рецепторы, через которые он оказывает свои эффекты (AdipoR1, AdipoR2 и T-кадгерин), расположены на множестве типов клеток, в том числе на эндотелии сосудов, кардиомиоцитах и других мышечных клетках. Показано, что в сердечно-сосудистой системе адипонектин обладает защитной функцией. Посредством взаимодействия с T-кадгерином он снижает апоптоз эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов при инфаркте миокарда, снижает развитие гипертрофии сердца,

защищает от пролиферации неоинтимы и от формирования атеросклеротических бляшек [41]. Адипонектин влияет также и на клетки жировой ткани: он снижает в адипоцитах накопление липидов и липидный метаболизм, а также повышает устойчивость жировой ткани к развитию воспаления [42; 43].

Помимо адипокинов жировая ткань продуцирует широкий спектр биологически активных веществ, которые способны влиять на дифференцировку предшественников адипоцитов, а также на рост кровеносных сосудов и нервных окончаний. Так, зрелые адипоциты активируют адипогенез за счет секреции различных простагландинов, особенно простациклина [44; 45], а ингибируют адипогенез за счет секреции эндотелина-1 и TNF α [46; 47]. При развитии ожирения адипоциты начинают секретировать избыточное количество TNF α и других провоспалительных цитокинов, включая MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1, моноцитарный хемотаксический фактор 1) и интерлейкина-6, которые вызывают инфильтрацию макрофагов в жировую ткань и стимулируют развитие инсулинорезистентности. Вероятно, с влиянием этих же цитокинов связана и активация апоптоза адипоцитов и преадипоцитов, которая наблюдается при развитии гиперплазии жировой ткани [48–51].

In vivo в жировой ткани предшественники адипоцитов, а также клетки, обеспечивающие её основные секреторные свойства, расположены в строме ткани и в стенке кровеносных сосудов. Именно за счет их дифференцировки и паракринной активности происходит обновление жировой ткани в норме и её ремоделирование при патологии. Эти клетки обозначают рядом различных терминов, в том числе: термином мезенхимные стромальные клетки (МСК), который мы использовали в данной работе.

1.2 Мезенхимные стромальные клетки

1.2.1 История изучения и общие свойства

МСК были впервые описаны Александром Яковлевичем Фриденштейном в 1966 году как популяция клеток костного мозга, отличающихся по свойствам от гемопоэтических стволовых клеток, но способных к клональному росту

(образованию фибробластоподобных колоний) и к дифференцировке в остеобласты, адипоциты, хондроциты и ретикулярные клетки [52–54]. Поскольку эти клетки дифференцировались в различных мезенхимных направлениях и были способны к самообновлению, они были названы мезенхимными стволовыми клетками [55]. Далее клетки с подобными свойствами были выделены в культуру из жировой ткани [56], кожи [57], эндометрия [58], пульпы зуба [59], периферической крови [60] и на сегодняшний день найдены практически во всех постнатальных тканях [61]. В процессе изучения свойств МСК оказалось, что лишь около 25% клеток способны к клональному росту и дифференцировке в трех направлениях (адипо-, хондро- и остеогенном) [62; 63]. А экспрессию в МСК генов плюрипотентности (SOX2, NANOG, POU5F1/OCT4, TERT и других) некоторые авторы ставят под сомнение [64; 65]. Поскольку МСК выделяют из стромы тканей и лишь небольшая часть из них проявляет свойства стволовых, в последнее время термин МСК стали расшифровывать не как мезенхимные стволовые, а как мезенхимные стромальные клетки [66].

В процессе изучения свойств МСК оказалось, что эти клетки сильно гетерогенны морфологически и функционально. Оказалось, что культивируемая популяция МСК содержит как некоммитированные мультипотентные клетки, так и клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировок [63; 67–69]. Учитывая выраженную гетерогенность, для описания характеристик МСК применяют анализ экспрессии поверхностных маркеров. Единый маркер для них до сих пор не выявлен, но показано, что более 95% МСК человека экспрессируют маркеры CD73, CD90, CD105 [63; 70]. При выделении МСК в культуру попадают клетки крови, эндотелий, а также клетки иммунной системы. Поэтому свежевыведенные МСК могут содержать некоторое количество клеток, экспрессирующих маркеры CD34 (маркер гемопоэтических клеток), CD31 (маркер эндотелия), CD14, CD19, CD45, CD79, HLA-DR (маркеры лейкоцитов). В процессе культивирования эти клетки элиминируются из популяции, но даже после 2-го пассажа их может оставаться 1-2% [70; 71]. Это связано, в том числе, и со спорным статусом некоторых маркеров: к примеру, CD34 по последним

данным, является не только гемопоэтическим, но и маркером множества других прогениторных клеток и характерен для МСК жировой ткани [72–76]. Кроме того, перициты, выделенные в культуру по экспрессии маркеров NG2, CD146 и PDGFR β , также соответствуют критериям МСК. На основании этих данных некоторые исследователи даже причисляют МСК к перицитам [77; 78]. Однако пока не установлено, выполняют ли МСК *in vivo* все функции перицитов (регулируют ли проницаемость, тонус кровеносных сосудов, их стабилизацию и т.д.) [66; 79].

Несмотря на перечисленные выше исключения, на сегодняшний день общепризнанным пока остается следующее определение МСК: мезенхимные стромальные клетки – это мультипотентные клетки стромально-васкулярной фракции ткани, которые способны к самоподдержанию при культивировании на пластике, дифференцируются в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях (рис. 2) и характеризуются набором поверхностных маркеров CD11b⁻CD14⁻CD34⁻CD45⁻CD73⁺CD79 α ⁻CD90⁺CD105⁺HLA-DR⁻ [70; 80]. МСК, выделенные из разных тканей не всегда одинаковы по дифференцировочному потенциалу и экспрессии поверхностных маркеров, однако обладают множеством общих свойств, в том числе сходной секреторной активностью [63; 81–83].

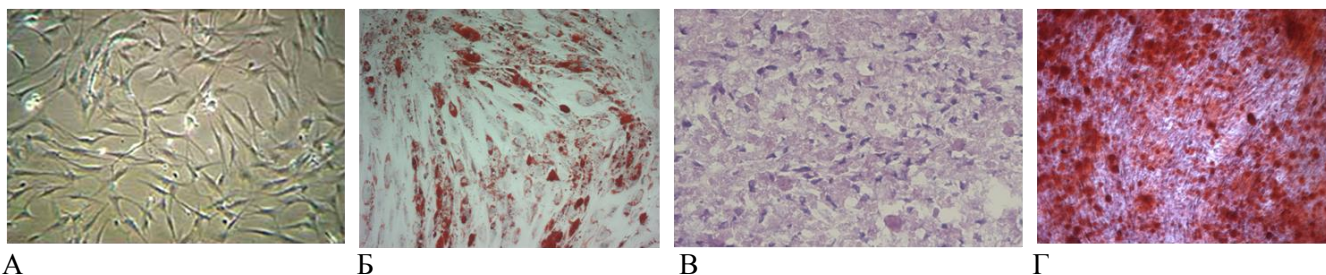


Рисунок 2. Мезенхимные стромальные клетки. А – морфология культивируемых МСК; Б-Г – дифференцированные МСК: Б – адипогенная дифференцировка (окраска масляным красным О), В – хондрогенная дифференцировка (окраска альциановым синим), Г – остеогенная дифференцировка (окраска ализариновым красным S).

1.2.2 Участие МСК в регенерации тканей

МСК обнаружили огромный потенциал для применения в регенеративной медицине и исследования в этой области позволили получить множество данных о влиянии МСК на обновление и регенерацию тканей [84]. Поскольку МСК способны к дифференцировке в различных направлениях, исследователи предполагали, что при введении МСК в зону повреждения, они начнут дифференцироваться в тканеспецифичные клетки и будут способствовать регенерации. И действительно, была показана эффективность введения МСК для лечения множества повреждений, таких как инфаркт миокарда [85–87], ожоги и трофические язвы [88; 89], травмы спинного и головного мозга, инсульты [90–92], повреждения печени, легких и почек [93; 94]. Кроме того, МСК также показали свою эффективность в восстановлении поврежденных сосудов и нервов: они стимулируют ангиогенез [85; 95; 96] и восстановление периферической иннервации [87; 97; 98].

Дальнейшие исследования позволили выявить два основных механизма, за счет которых МСК реализуют свой регенеративный потенциал: дифференцировка самих МСК в тканеспецифичном направлении или же секреция ими паракринных факторов, стимулирующих регенерацию [99]. Изучение транскриптома, протеома МСК и состава кондиционированной ими культуральной среды позволили определить, что МСК экспрессируют и секретируют огромный список различных факторов роста, цитокинов, хемокинов и иммуномодулирующих веществ, а также внеклеточных везикул, которые стимулируют регенерацию.

Для функционирования ткани в норме и для ее успешной регенерации при повреждении первоочередной задачей является поддержание васкуляризации, поскольку кровеносные сосуды обеспечивают поступление в ткань питательных веществ и осуществляют газообмен. МСК секретируют такие важнейшие проангиогенные факторы, как VEGF, bFGF, PlGF, MCP-1 [100], которые снижают интенсивность апоптоза эндотелиальных клеток, а также стимулируют пролиферацию, миграцию эндотелиальных клеток и формирование новых сосудов (ангиогенез). МСК стимулируют ангиогенез за счет секреции, а сами при

этом встраиваются в периэндотелиальное пространство вновь формирующихся сосудов и способствуют их стабилизации, выполняя роль перицитов [96; 98]. Кроме того, секреторные факторы МСК способствуют мобилизации из костного мозга эндотелиальных предшественников, которые затем попадают в кровоток, дифференцируются и также участвуют в регенерации [96; 101].

Помимо ангиогенеза для функционирования ткани чрезвычайно важно поддержание иннервации и восстановление нервов при повреждении (нейрорегенерация). МСК также играют в этом процессе немалую роль. Так, было показано, что МСК имеют множество нейропротекторных свойств: стимулируют реиннервацию миокарда после инфаркта [102], регенерацию периферических нервов конечностей [98], поддерживают пролиферацию и функционирование Шванновских клеток [103], перспективны для лечения нейродегенеративных заболеваний [104; 105]. Роль МСК в процессах нейрорегенерации еще мало изучена, однако вероятно, что МСК не только стимулируют прорастание новых аксонов и пролиферацию Шванновских клеток, но и увеличивают выживаемость клеток нервной системы непосредственно в момент повреждения за счет секреции нейротрофических факторов [106–110]. Действительно, было показано, что МСК секретируют ряд важнейших нейротрофических факторов, таких как NGF, BDNF, GDNF [96; 98; 111].

Изучение секреторных свойств МСК показало, что помимо регуляции ангиогенеза и нейропротекторных эффектов МСК влияют на множество других процессов в тканях: препятствуют фиброзу за счет секреции HGF [112], секретируют хемокины, привлекающие в зону повреждения гемопоэтических и эндотелиальных предшественников [113], секретируют факторы, ингибирующие апоптоз [113–115] и вызывающие иммуносупрессию [116–118]. При этом данные последнего времени указывают на то, что большую роль в секреции МСК играют внеклеточные везикулы, посредством которых могут эффективно транспортироваться как белковые факторы, так и различные мРНК, регуляторные микроРНК, влияющие на метаболизм ткани [119–124].

Суммируя дифференцировочный и секреторный потенциал МСК, можно заключить, что МСК – это основные регуляторы обновления тканей: они дифференцируются в тканеспецифичные клетки, активируют ангиогенез и нейрорегенерацию, препятствуют апоптозу и фиброзу, привлекают в зону повреждения специфические клетки-предшественники, а также регулируют иммунный ответ [119–122]. Однако регуляция регенеративного потенциала МСК, в особенности *in vivo*, до сих пор активно изучается и до конца не определена. На сегодняшний день есть множество разрозненных данных о различных факторах, влияющих на дифференцировку МСК и их секрецию. Так, есть данные о том, что важную роль в регуляции МСК играют пуриnergическая сигнализация [125–127], активные формы кислорода (АФК) [128; 129], различные микроРНК [130–133], механический стресс [134], гипоксия [135; 136], взаимодействие МСК с клетками иммунной системы [118; 137], цитокины и факторы роста, такие как TNF α и PDGF [128; 138; 139]. В контексте обновления жировой ткани важно принять во внимание множество данных о влиянии на адипогенез и липидный обмен различных гормонов эндокринной системы [37], а также выраженную эндокринную активность самой жировой ткани (см. главу 1.1.2). Поэтому вероятно, что гормоны играют основополагающую роль в обновлении и регуляции метаболизма жировой ткани. Гормональная регуляция МСК на момент начала данной работы была практически не изучена. В нашей лаборатории было показано, что МСК экспрессируют рецепторы ко множеству различных гормонов. В том числе: рецепторы к ангиотензину II, который является ключевым участником многокомпонентной ренин-ангиотензиновой системы. Рассмотрим функционирование этой системы более подробно.

1.3 Ренин-ангиотензиновая система

1.3.1 Классическое представление. Циркулирующая РАС

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) долгое время описывалась исключительно как циркулирующая эндокринная система, главная роль которой в организме – регуляция кровяного давления и поддержание солевого гомеостаза. В

этом процессе участвуют несколько скоординировано работающих органов: печень, почки, легкие, кровеносные сосуды и надпочечники. Основным эффектор РАС – гормон ангиотензин II (Ang II). Предшественником Ang II является ангиотензиноген, который синтезируется в печени. В юкстагломерулярных клетках почек вырабатывается фермент ренин – протеаза, расщепляющая ангиотензиноген до декапептида ангиотензина I (Ang I). В легких и в общем кровотоке присутствует ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), который расщепляет Ang I до октапептида Ang II (рис. 3) [140]. Ангиотензиноген и АПФ циркулируют в крови в избытке, а образование Ang II лимитируется секрецией ренина. При снижении кровоснабжения почек – за счет падения артериального давления, сужения почечных сосудов или снижения концентрации ионов натрия в крови - секреция ренина усиливается. Это, в конечном итоге, приводит к увеличению концентрации Ang II в крови. Ang II обладает двумя основными эффектами: вызывает сужение сосудов и стимулирует секрецию альдостерона в коре надпочечников. Альдостерон, в свою очередь, повышает реабсорбцию натрия в дистальных канальцах и в собирательных трубчатках почек, увеличивая задержку воды в почках. Кроме того, секретируемый альдостерон повышает чувствительность гладких мышц сосудов к вазоконстрикторным агентам, усиливая, тем самым, эффект Ang II. Таким образом, через прямое суживающее действие на сосуды и за счет стимуляции выброса альдостерона, Ang II участвует в регуляции обмена натрия, объема внеклеточной жидкости и кровяного давления [141].

Ang II связывается с двумя основными видами специфических рецепторов: рецептором первого типа – AT1 и рецептором второго типа – AT2 (рис. 3). Вазоконстрикция и выброс альдостерона обеспечиваются за счет связывания Ang II с AT1-рецептором. Связывание Ang II с AT2-рецептором вызывает противоположный эффект: вазодилатацию [140]. Аффинность Ang II к обоим типам рецепторов одинакова, однако представленность AT1-рецепторов в организме человека значительно выше, чем AT2-рецепторов, поэтому основной эффект Ang II оказывает через AT1-рецептор: повышает артериальное давление [142].

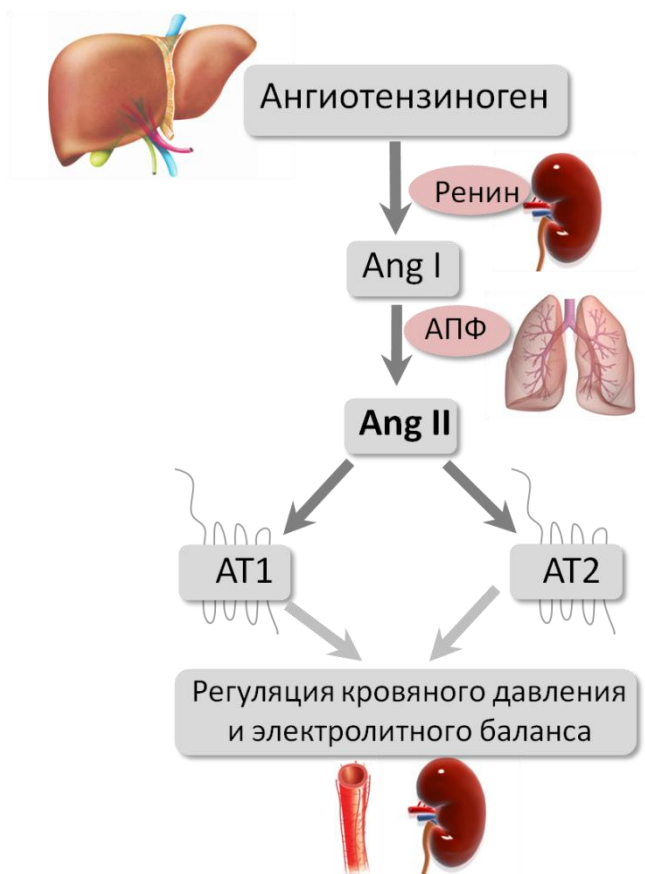


Рисунок 3. Циркулирующая ренин-ангиотензиновая система (РАС).

Ang I – ангиотензин I, Ang II – ангиотензин II, АПФ – ангиотензинпревращающий фермент, AT1 – рецептор 1-го типа к Ang II, AT2 – рецептор 2-го типа к Ang II.

Дальнейшее изучение РАС показало, что функционирование Ang II в организме не ограничивается регуляцией кровяного давления. Оказалось, что этот гормон влияет на ряд других очень важных процессов: на воспаление, развитие гипертрофии и фиброза, окислительный стресс, пролиферацию клеток, дифференцировку и апоптоз [142–149]. Таким образом, на сегодняшний день стало очевидно, что Ang II является важным регулятором регенерации и репарации тканей. При этом, как и в случае регуляции кровяного давления, эффекты Ang II на регенерацию могут быть различными и зависят от типа рецепторов, с которыми он взаимодействует.

1.3.2 Рецепторы к Ang II. Структура и сигнализация

AT1-рецептор

AT1-рецептор к Ang II состоит из 359 аминокислот и имеет молекулярную массу 41 кДа. У человека ген AT1 рецептора - AGTR1 - расположен в хромосоме 3 и не имеет изоформ [150], у грызунов же существуют две изоформы рецептора: AGTR1A, AGTR1B, имеющие 94% сходства последовательностей [151]. AT1-рецептор относится к семидоменным рецепторам, сопряженным с G-белками – GPCRs (G-protein-coupled receptors). Внеклеточная петля и трансмембранные домены играют важную роль в связывании Ang II. Антагонисты же к Ang II имеют иные сайты связывания и взаимодействуют только с трансмембранным доменом [142]. Селективные антагонисты AT1-рецепторов – бифенилимидазолы – такие, как лозартан, кандесартан, валсартан, телмисартан, ирбесартан (ARBs - angiotensin receptor blockers).

AT1-рецепторы очень широко представлены в организме человека: они экспрессируются в эндотелии сосудов, в гладкомышечных клетках, в почках и надпочечниках, в сердце, легких, мозге, печени, жировой ткани, органах репродуктивной системы и множестве других тканей [152]. Поскольку Ang II регулирует объем жидкостей, то наличие рецепторов к нему необходимо в головном мозге, где поддержание гомеостаза чрезвычайно важно. AT1-рецепторы экспрессированы в тех отделах мозга, где ослаблен гематоэнцефалический барьер и куда проникает Ang II из крови: в органах циркумвентрикулярной системы, в гипоталамусе и продолговатом мозге [153; 154]. В надпочечниках AT1-рецепторы расположены в основном в клубочковой зоне коркового вещества и хромафинных клетках мозгового вещества [155]. В сердце наибольшая плотность AT1-рецепторов наблюдается в проводящей системе, некоторое количество присутствует в эпикарде вокруг предсердий и в миокарде [152]. В сосудах AT1-рецептор активно экспрессируется в стенке аорты, легочных и брызжеечных артериях (в больших количествах в гладкомышечных клетках и в меньших – в адвентиции) [142].

AT1-рецептор является классическим GPCR и при связывании его с Ang II может активироваться множество сигнальных путей (рис. 4). Наиболее хорошо описанный путь – активация Gαq/11 субъединицы, что приводит к активации фосфолипазы C-β. В результате образуется инозитол(1,4,5)-трисфосфат, стимулирующий выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо и диацилглицерин (ДАГ), активирующий протеникиназу C (PKC). Кроме того, AT1-рецептор задействован в открытии Ca^{2+} -каналов на плазматической мембране, что приводит к входу внеклеточного Ca^{2+} внутрь клетки. Ca^{2+} в цитоплазме связывается с кальмодулином или тропонином, что активирует киназу легких цепей миозина и приводит к сокращению гладкомышечных клеток сосудов – вазоконстрикции [142]. PKC может активировать Ras/Raf/MEK/ERK1/2 (MAP-киназные) пути, что также вызывает вазоконстрикцию и обуславливает стимулирующее влияние Ang II на рост, пролиферацию клеток и развитие гипертрофии [148]. Помимо этих путей внутриклеточной сигнализации, связывание Ang II с AT1-рецептором может активировать такие Gα-субъединицы как G12/13 и Gi, димер Gβγ. Сигнализация Ang II через G12/13 и Gβγ белки приводит к активации каскадов фосфолипаз A2 и D, Rho-ассоциированных киназ и других сигнальных молекул, что может стимулировать воспаление, оксидативный стресс и развитие атерогенеза [156–161]. В случае, когда AT1-рецептор ассоциирован с ингибиторным G_{i/o}-белком (в печени, почках, клубочковом слое надпочечников, гипофизе), его активация Ang II ингибирует аденилатциклазу, снижая продукцию цАМФ и стимулируя вазоконстрикцию [142].

Помимо классических, для AT1-рецептора описаны G-белок независимые сигнальные пути, опосредованные нерецепторными тирозинкиназами (путь, характерный для факторов роста) и β-аррестинами (рис. 4). При тирозинкиназном сигнальном пути происходит активация фосфолипазы C-γ, которая задействует сигнальные каскады MAP-киназ, JAK-киназ (Janus kinase) и STAT-белков (signal transducers and activators of transcription). Аналогично PKC пути, это активирует рост и пролиферацию клеток [142]. β-аррестины преимущественно осуществляют десенситизацию рецептора при длительном воздействии лиганда, а также

обуславливают другие G-белок независимые сигнальные каскады [148]. Кроме того, было показано, что при активации Ang II AT1-рецептор интернализуется [162].

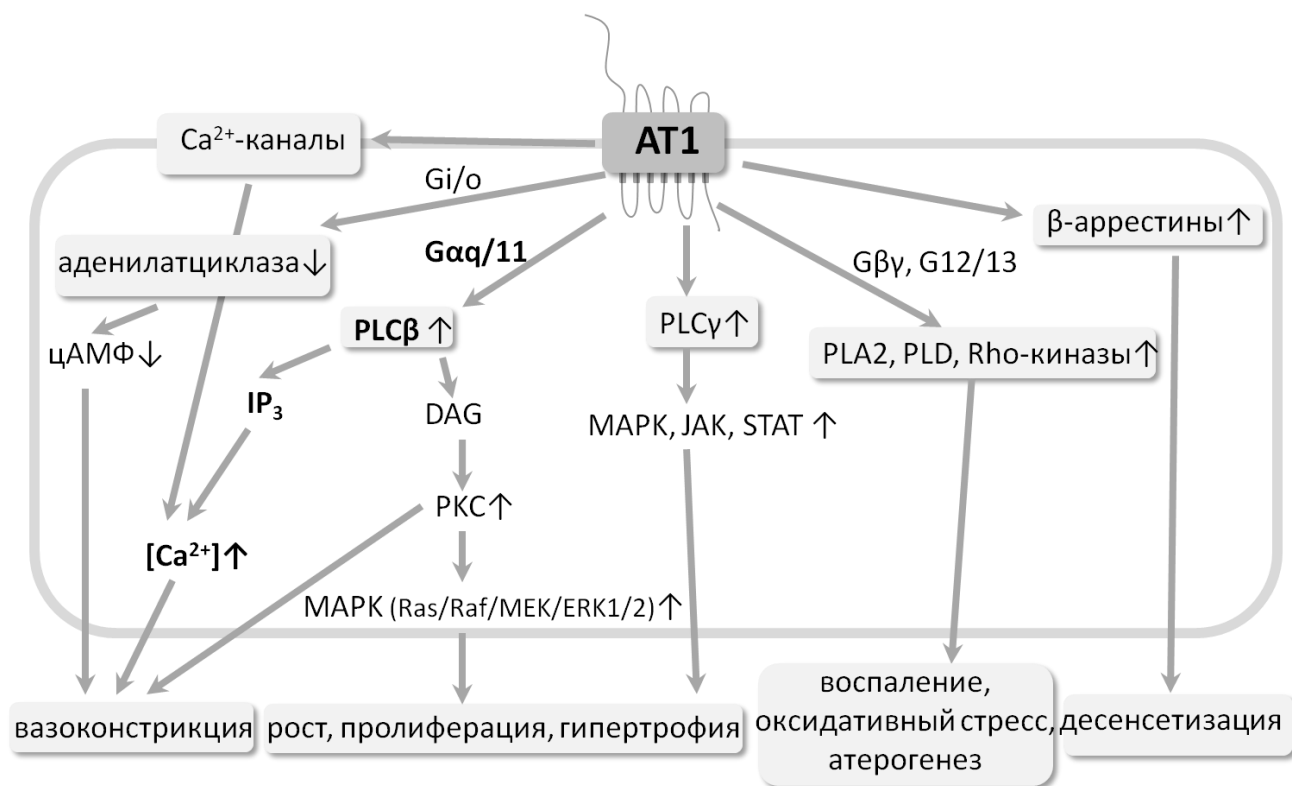


Рисунок 4. Сигнальные пути AT1-рецепторов к Ang II. AT1 – рецептор 1-го типа к Ang II; PLCβ, PLCγ, PLA2, PLD – фосфолипазы β, γ, A2 и D; PKC – протеинкиназа C; IP3 – инозитолтрисфосфат; DAG – диацилглицерин; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; JAK – Янус-киназа; STAT – сигнальный белок и активатор транскрипции; ERK1/2 – внеклеточные сигнал-активируемые киназы 1/2.

Стимуляция через AT1-рецептор воспаления, клеточной пролиферации, вазоконстрикции, атерогенеза и гипертрофии связаны с отрицательными эффектами Ang II на организм человека, которые на сегодняшний день ассоциируют с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, ожирения и метаболического синдрома.

AT₂-рецептор

AT₂-рецептор к Ang II также является семидоменным, сопряженным с G-белками (GPCR). Он состоит из 363 аминокислот, имеет молекулярный вес 41 кДа и имеет всего лишь 34% сходства последовательности аминокислот с AT₁-рецептором. Ген AT₂-рецептора (AGTR2) расположен на X-хромосоме и не имеет интронов, а его мРНК не имеет сплайс-вариантов. Селективные антагонисты AT₂-рецепторов – тетрагидроимидазолпиридины PD123319, PD123177 и CGP42112 [142], селективный агонист – C21 [163].

Принято считать, что AT₂-рецептор играет важную роль в регуляции клеточной дифференцировки и органогенезе, поскольку активно экспрессируется в мезенхимных тканях во время эмбриогенеза. Несмотря на то, что экспрессия AT₂-рецептора после рождения быстро снижается до недетектируемого уровня в ряде тканей, рецептор постоянно присутствует в небольшом количестве в таких органах, как сердце, надпочечники, почки, мозг, жировая ткань, эндотелий сосудов и органы репродуктивной системы [164]. Причем экспрессия рецепторов в конкретном органе сильно варьирует между видами млекопитающих. У человека AT₂-рецепторы в мозге экспрессируются в основном в области мозжечка [165], в сердце они расположены на фибробластах интерстиции и в меньшем количестве - в миокарде [166]. В надпочечниках AT₂-рецепторы экспрессируются в мозговом веществе, а в почках – в клубочковой зоне, канальцах и кровеносных сосудах. В миометрии экспрессия AT₂-рецепторов высока, но подавляется при беременности [142]. Активация экспрессии AT₂-рецептора происходит при некоторых заболеваниях и повреждениях, а также под действием таких факторов, как Ang II, инсулин и различные факторы роста [142].

В отличие от классических белков GPCRs, AT₂-рецептор после активации не связывается с β -аррестинами, поэтому не десенситизируется и не интернализуется [167]. Кроме того важно, что AT₂-рецептор может быть конститутивно активным и проявлять свои эффекты независимо от связывания с лигандом, чему способствует его димеризация с другими GPCRs или взаимодействие со специфическими рецептор-связывающими белками [168].

Показано, что формирование гомодимеров AT₂-рецептора усиливает его биологические эффекты. Гомодимеры образуются преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), а уже потом транслоцируются на клеточную мембрану. Выход рецепторов на мембрану могут стимулировать такие факторы, как АФК, например оксид азота NO [164]. Также для AT₂-рецепторов описано формирование гетеродимеров. К примеру, AT₂-рецепторы формируют гетеродимеры с AT₁-рецепторами, что приводит к ингибированию эффектов AT₁-рецепторов, а также снижает их экспрессию [169; 170]. Кроме того, есть свидетельства того, что AT₂-рецепторы формируют гетеродимеры с рецепторами к брадикинину и дофамину, что может влиять на опосредованный ими водно-солевой обмен [164]. Также интересно, что AT₂-рецепторы взаимодействуют с рецепторами MAS1 к другому типу ангиотензина – ангиотензину (1-7) (Ang(1-7), см. далее главу 1.3.3). При этом эффекты, опосредованные MAS1 рецептором, блокируются ингибиторами AT₂-рецепторов и наоборот. Вероятно, эти два типа рецепторов имеют общие механизмы сигнализации, которые компенсируют друг друга в случае, если один из них неактивен [5; 171].

Несмотря на то, что AT₂-рецептор относится к довольно хорошо изученному классу GPCRs, его сигнальные каскады все еще определены не полностью и для многих путей не выяснено, являются ли они G-белок зависимыми. По всей видимости, основные участники этих каскадов – различные фосфатазы (рис. 5). Показано, что AT₂-рецептор может как активировать, так и ингибировать фосфатазы, регулирующие ERK1/2 MAP-киназные каскады. К примеру, в почках Ang II через AT₂-рецептор приводит к фосфорилированию ERK1/2 и активации брадикинин-NO-цГМФ пути, что в итоге производит эффект вазодилатации и противофибротическое действие [164]. В некоторых тканях при воздействии Ang II через AT₂-рецептор происходит активация фосфотирозин-фосфатаз, что через дефосфорилирование ERK1/2 активирует апоптоз и тормозит неконтролируемую пролиферацию клеток, а также снижает формирование АФК [164; 172].

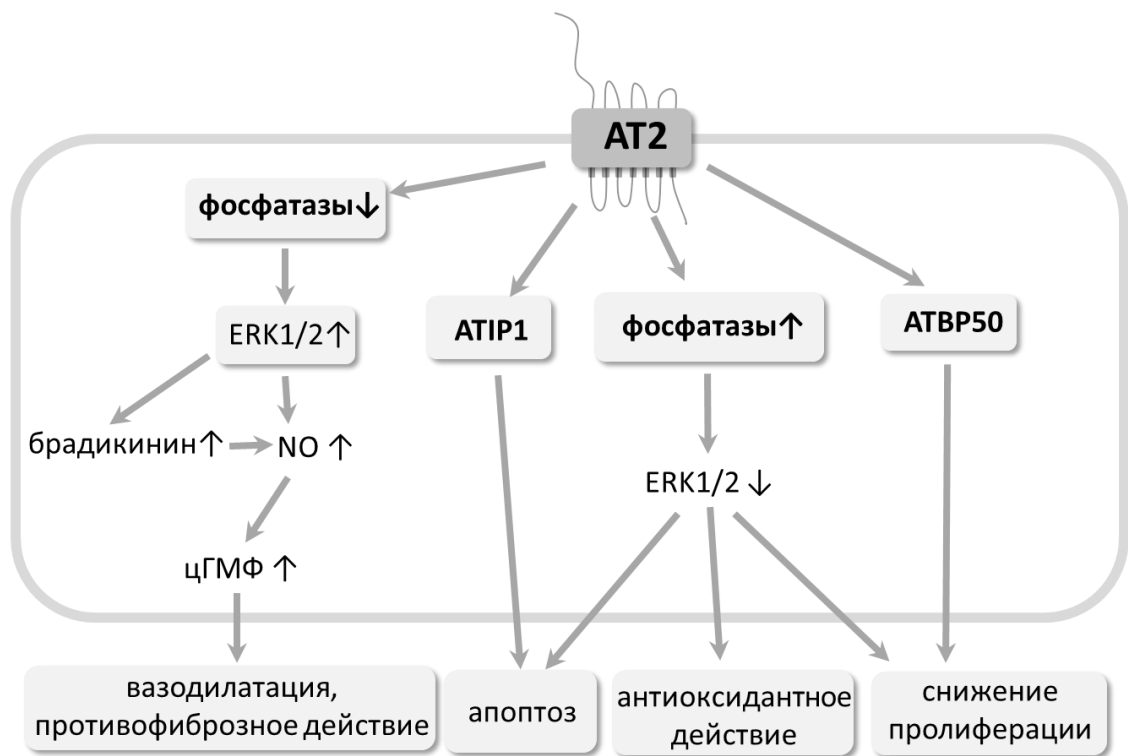


Рисунок 5. Сигнальные пути AT2-рецепторов к Ang II. AT2-рецептор может как активировать, так и ингибировать фосфатазы, регулирующие ERK1/2 MAP-киназные каскады. AT2 – рецептор 2-го типа к Ang II; ERK1/2 – внеклеточные сигнал-активируемые киназы 1/2, ATIP1 – белок, взаимодействующий с AT2-рецептором; ATBP50 – белок массой 50кДа, связывающий AT2-рецептор.

Кроме того, в последнее время накоплен ряд данных о том, что AT2-рецепторы имеют несколько белков-партнеров, которые связываются с ними и регулируют их функции. Так, конститутивная активность AT2-рецептора и его про-апоптотические свойства, вероятно, также обусловлены связыванием с белком ATIP1 (AT2-receptor interacting protein), а его представленность на мембране и противоопролиферативное действие – связыванием с белком ATBP50 (AT2R binding protein of 50 kDa) – см. рис. 5 [164]. Эффекты, возникающие при связывании AT2-рецептора с белком PLZF (promyelocytic zinc finger protein) требуют дальнейшего уточнения, но на мышинных моделях было показано, что в некоторых условиях это вызывает нехарактерную для AT2-рецепторов стимуляцию фиброза и гипертрофии сердца [173]. По некоторым данным, Ang II

через AT2-рецептор также может регулировать внутриклеточный pH, предотвращая ацидоз, возникающий при гипоксии [174].

Активация AT2-рецепторов связана с так называемой «защитной ветвью» РАС и играет важную роль в стимуляции регенерации после повреждения, ингибировании воспаления и ремоделирования тканей. Также же данные последнего времени свидетельствуют о том, что AT2-рецептор чрезвычайно важен в развитии, физиологии и регенерации органов нервной системы [164].

1.3.3 Локальные РАС. Влияние на метаболизм жировой ткани

В ходе изучения свойств Ang II было обнаружено, что РАС может функционировать не только за счет секреции Ang II и его предшественников в кровь из разных органов («циркулирующая» РАС). Оказалось, что все основные компоненты системы (ангиотензиноген, ренин, АПФ и ангиотензиновые рецепторы) могут экспрессироваться локально, в одной и той же ткани. Такие «локальные» или «тканевые» РАС были обнаружены в почках [175; 176], в сердце и в стенке кровеносных сосудов [177–179], в мозге [180], в жировой ткани [181–183] и во множестве других органов [184–186].

В локальную РАС, помимо классических компонентов, может входить ряд других ферментов и рецепторов. С помощью таких ферментов Ang I и Ang II могут подвергаться протеолитическому расщеплению с образованием других ангиотензиновых пептидов, которые метаболически активны и имеют свои специфические рецепторы. Поэтому сегодня схема РАС приобрела значительно более расширенный вид (подробно см. обзоры [3; 5; 187–189]). Часть компонентов локальной РАС представлена на рис. 6. Наиболее распространенные неканонические участники локальной РАС: ангиотензинпревращающий фермент 2 (АПФ2), фермент неприлизин, с помощью которых из Ang I и Ang II может образовываться гептапептид Ang 1-7. Роль АПФ2 также может выполнять фермент ангиотенгиназа С (PRCP) [190]. Ang 1-7 далее может расщепляться до другого ангиотензинового пептида – аламандина [3; 191]. Конкретные протеолитические ферменты, участвующие в тканях в его формировании пока не

выявлены. Ang 1-7 и аламандин имеют свои специфические рецепторы MAS1 и MrgD, соответственно. Эти рецепторы оказывают эффекты, аналогичные эффектам Ang II через AT2-рецептор. Поэтому взаимосвязи Ang 1-7/MAS1 и аламандин/MrgD также называют защитными ветвями РАС [3; 187].

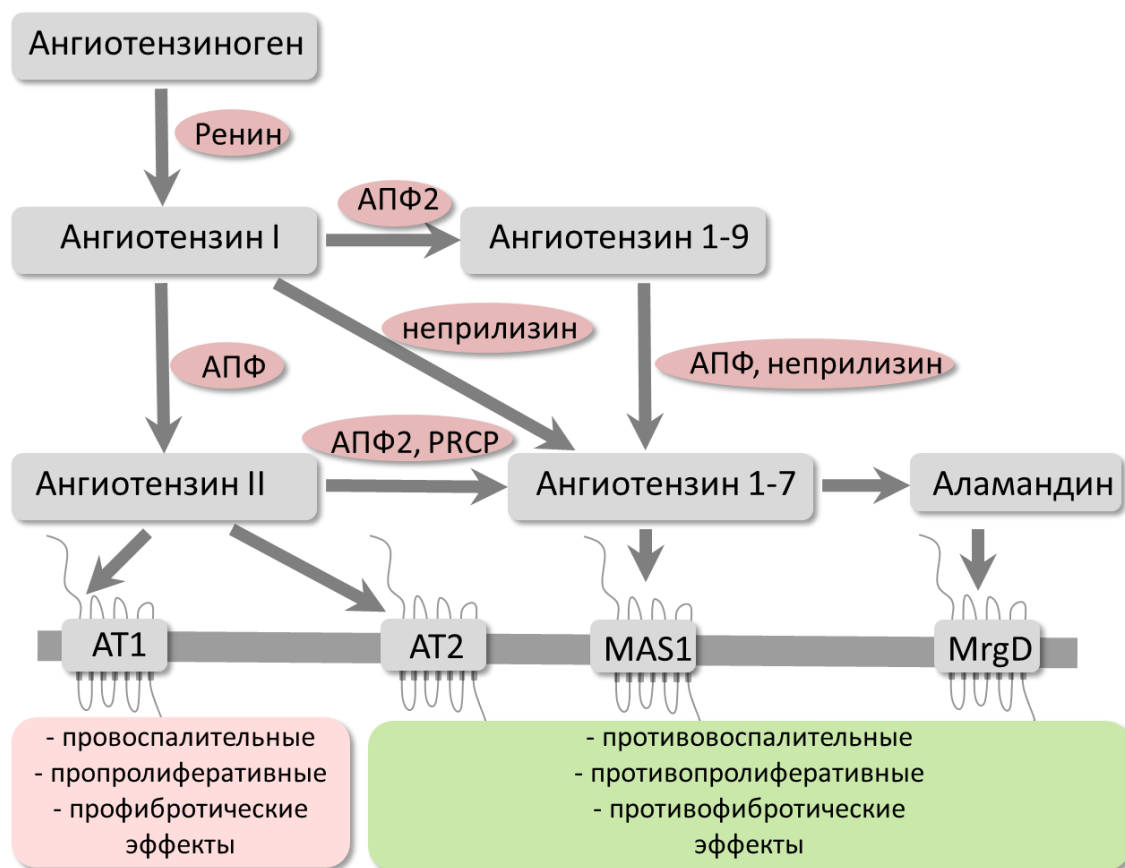


Рисунок 6. Локальная ренин-ангиотензиновая система. АПФ – ангиотензинпревращающий фермент, АПФ2 – ангиотензинпревращающий фермент 2, PRCP – ангиотенгиназа С, AT1 – рецептор первого типа к Ang II, AT2 – рецептор второго типа к Ang II, MAS1 – рецептор к Ang 1-7, MrgD – рецептор к аламандину.

Дальнейшее изучение показало, что наряду с циркулирующей РАС, локальные РАС также участвуют в поддержании гомеостаза тканей и их регенерации после повреждения. На сегодняшний день известно, что локальная РАС влияет на метаболизм сосудов, сердца, почек, печени, жировой ткани, органов центральной нервной системы и ряда других. При этом показано, что компоненты именно локальной РАС задействованы в формировании таких

дисфункций, как атеросклероз, гипертрофия сердца, фиброз почек, диабет второго типа, инсулинорезистентность и ожирение [192], Причем экспрессия компонентов РАС при таких патологиях чаще всего усиливается: возрастает уровень ангиотензиногена, активность АПФ и уровень Ang II [4]. Поэтому ингибиторы АПФ или же AT1-рецептора показали свою эффективность и получили очень широкое распространение в терапии гипертензии, гипертрофии сердца, инфаркта миокарда, хронической сердечной недостаточности и диабетической нефропатии [6].

Все основные компоненты локальной РАС были обнаружены и в жировой ткани: показано, что в ней активно экспрессируется ангиотензиноген, ренин, АПФ, присутствуют AT1- и AT2-рецепторы [193; 194]. При этом локальная РАС оказывает и аутокринное, и паракринное, и даже эндокринное действие на жировую ткань и другие органы. К примеру, оказалось, что просвет сосудов жировой ткани регулируется преимущественно локальным Ang II, а не циркулирующим [195]. Напротив, компоненты локальной РАС жировой ткани поступают в общий кровоток и у людей с избыточной массой тела могут вносить вклад в развитие гипертензии [196]. Кроме того, локальный Ang II стимулирует воспаление внутри жировой ткани, активируя экспрессию белка MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) или же усиливая оксидативный стресс [197; 198]. Также Ang II через AT2-рецептор стимулирует в адипоцитах липогенез, усиливая активность FAS (fatty acid synthase) и GPDH (glycerol phosphate dehydrogenase) [199].

Показано, что локальный Ang II в жировой ткани влияет и на дифференцировку новых адипоцитов. Но об этом у различных авторов есть ряд противоречивых данных. В большинстве работ показано, что Ang II ингибирует адипогенез [6; 182; 200–202]. К примеру, адипоциты с помощью эндогенного Ang II ингибируют дифференцировку преадипоцитов через AT1-рецептор [6]. В противоположность этому, показано, что Ang II оказывает активирующее действие на дифференцировку преадипоцитов из висцерального жира и жировой капсулы почек [203]. Общий эффект Ang II на адипогенез зависит от источника и

видовой принадлежности преадипоцитов, от стратегии дифференцировки, а также от применяемого дифференцировочного коктейля. Кроме того, эффект Ang II на адипогенез может быть гетерогенным и, вероятно, зависит от представленности и функциональной активности AT1- и AT2-рецепторов. Именно поэтому изучение адипогенеза на общей популяции преадипоцитов может описывать не полную картину функционирования РАС в жировой ткани [143; 204].

Все компоненты локальной РАС были обнаружены в МСК, выделенных из различных тканей. При этом локальная РАС в МСК функциональна и влияет на их регенеративные свойства [143; 201; 205]. Так, Ang II стимулирует в МСК секрецию арахидоновой кислоты [206], регулирует дифференцировку МСК в ГМК-подобные клетки, в кардиомиоциты [207; 208], в эндотелиальные клетки [209]. Кроме того, было показано, что в ряде случаев Ang II через AT1-рецептор активирует секрецию в МСК VEGF и других факторов роста, за счет чего стимулирует их ангиогенные свойства [210–214]. Влияние Ang II на секрецию в МСК нейротрофических факторов ещё практически не изучено, однако есть ряд данных об эффектах Ang II на нейрорегенерацию в целом: стимуляция AT2-рецептора повышает выживаемость нейронов и клеток глии после инсульта [215], помогает в лечении нейродегенеративных заболеваний и когнитивных дисфункций [216; 217], повышает экспрессию BDNF и снижает апоптоз нейронов при травмах спинного мозга [144; 218]. С защитным влиянием Ang II через AT2-рецептор связан активный поиск и изучение свойств агонистов AT2-рецептора, таких как C21. Кроме того, аналогичные нейропротективные эффекты оказывают и антагонисты AT1-рецептора, используемые в лечении сердечно-сосудистых заболеваний [219; 220]. То есть, нейрорегенеративные эффекты Ang II аналогичны таковым для МСК. И вероятно, что Ang II оказывает свое влияние на нейрорегенерацию, не только напрямую воздействуя на клетки нервной системы, но и через локальную РАС МСК.

Таким образом, Ang II и другие компоненты РАС регулируют не только кровяное давление и солевой гомеостаз, как это считалось ранее. На сегодняшний день стало очевидно, что Ang II активно влияет, в том числе, на клеточную

пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, секрецию факторов роста, на развитие воспаления, на регенерацию нервов и сосудов и на множество других процессов метаболизма. Причем направленность влияния Ang II зависит от представленности и функционирования рецепторов к этому гормону.

Поскольку компоненты РАС присутствуют не только в циркулирующем виде в крови, но и локально в тканях, то Ang II может быть паракринным регулятором процессов регенерации внутри самой ткани. Как уже упоминалось ранее, обновление жировой ткани происходит за счет МСК – сильно гетерогенной популяции клеток, в регуляции активности которых Ang II, вероятно, играет важную роль. Экспрессия и функционирование компонентов локальной РАС в МСК жировой ткани ещё практически не описаны. Поэтому изучение эффектов Ang II на регенеративную активность МСК жировой ткани стало целью данного исследования.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Выделение МСК из жировой ткани человека

МСК выделяли из подкожной жировой клетчатки, которую забирали после подписания информированного согласия у здоровых доноров (без острого воспаления, диабета или онкологических заболеваний, с индексом массы тела 23.5 ± 2.4) при абдоминальных хирургических операциях. Часть ткани была одновременно использована для иммуофлуоресцентного окрашивания *in situ* (см. далее). Для выделения МСК жировую ткань измельчали, помещали в равный объем раствора Хэнкса (ПанЭко) с коллагеназой первого типа (200 ед/мл, Worthington, США), диспазой (40 ед/мл, Corning, США) и инкубировали 1 час при 37 °С с перемешиванием. Фракцию адипоцитов отделяли центрифугированием (10 мин, 200 RCF). Осадок ресуспендировали в 10-кратном объеме буфера для лизиса эритроцитов (150 мМ NH_4Cl , 10 мМ KHCO_3 , 0,1 мМ динатриевой соли ЭДТА), инкубировали 10 минут, центрифугировали 5 минут при 200 RCF. Полученный осадок разводили в полной среде роста (см. ниже), фильтровали от крупных фрагментов ткани через 100 мкм клеточное сито (Corning, США) и высаживали на чашки для адгезивных эукариотических культур. Через 1 сутки полученную культуру клеток отмывали от неприкрепившихся структур. При достижении клетками 90% монослоя, культуру МСК пассировали, высаживая на чашки по 25% клеток от монослоя. Для экспериментов использовали МСК 2-5 пассажей.

2.2 Культивирование клеток

МСК растили в среде Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (SH30879.02, HyClone, GE Healthcare Life Sciences, США) с добавлением 10% AdvanceSTEM Growth Supplement (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 250 нг/мл амфотерицина В (SV30079.01, HyClone, GE Healthcare Life Sciences, США). Клетки нейробластомы мыши линии Neuro2A растили в модифицированной Дульбекко среде Игла с 4,5 г/л глюкозы (DMEM, Dulbecco's modified Eagles medium, ПанЭко, Россия) с добавлением 10%

фетальной бычьей сыворотки (fetal bovine serum – FBS, HyClone, GE Healthcare Life Sciences, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Для снятия с чашки клетки промывали раствором Версена (ПанЭко, Россия). После чего добавляли раствор HyQTase™ Cell Detachment Reagent (в случае с МСК, SV30030.01, HyClone, GE Healthcare Life Sciences, США) или 0,25% трипсина (в случае с Neuro2A, SV30031.01, HyClone, GE Healthcare Life Sciences, США), инкубировали до открепления клеток от поверхности чашки (2-3 мин при 37 °C) и суспендировали в среде роста. Культивирование обеих линий вели при 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

2.3 Иммунофлуоресцентное окрашивание ангиотензиновых рецепторов in situ в жировой ткани и in vitro в культуре МСК

Для выявления ангиотензиновых рецепторов in situ жировую ткань помещали в Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Inc., Tokyo, Japan), замораживали в жидком азоте и с помощью криотома изготавливали криосрезы толщиной 10 мкм. Для окраски in vitro в культуре клетки растили на покровном стекле до достижения 70% монослоя. Затем срезы и клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 минут, отмывали натрий-фосфатным буфером (Phosphate-buffered saline, PBS) и инкубировали в 0,1% БСА с 10% ослиной сывороткой для блокирования неспецифического связывания антител. Далее срезы и клетки окрашивали специфическими антителами против AT1-рецептора (Rabbit polyclonal, PA5-20812, ThermoFisher Scientific, разведение 1:100), AT2-рецептора (Rabbit polyclonal, AAR-012, Alomone Labs) и MAS1-рецептора (Rabbit polyclonal, ab66030, Abcam). Для определения сококализации ангиотензиновых рецепторов с кровеносными сосудами и МСК in situ срезы жировой ткани окрашивали антителами против эндотелиального маркера CD31, а также против маркеров МСК CD90 и PDGFRβ (Mouse, BD Pharmingen). Для негативных контролей использовали изотипические кроличьи и мышьиные IgG в тех же концентрациях, что и специфические антитела. Первичные антитела визуализировали с помощью вторичных антител, конъюгированных с

флуоресцентными метками: Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, разведение 1:1000) и Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Molecular Probes, разведение 1:1000). Окраску первичными и вторичными антителами проводили при комнатной температуре в течение 1 часа с последующими троекратными отмывками буфером PBS. Ядра окрашивали раствором DAPI (Molecular Probes, 20 мкг/мл) в течение 10 минут в темноте и отмывали PBS. Клетки и срезы заключали в Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc) и анализировали с помощью флуоресцентных микроскопов Leica DM6000B (камера Leica DFC 360FX) и LSM 780 (программное обеспечение ZEN2010, Zeiss).

2.4 Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток

Доля клеток, экспрессирующих рецепторы к Ang II, их фенотип, а также экспрессия АПФ были проанализированы с помощью проточной цитофлуориметрии. Клетки снимали с чашки раствором HyQTase Cell Detachment Reagent (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, США) и окрашивали специфическими антителами. Окраску проводили в растворе PBS с добавлением 1% БСА в концентрации около 10^6 клеток/мл, 1 час первичными антителами, 1 час вторичными антителами, после снятия с чашки и между окрасками клетки промывали PBS. Все операции после снятия клеток с чашки проводили при комнатной температуре, либо на льду (для блокирования интернализации рецепторов). AT1-рецепторы детектировали антителами PA5-20812 (ThermoFisher Scientific, разведение 1:100), с последующей окраской вторичными антителами DyLight 488 (711-485-152, Jackson ImmunoResearch, 1:300), AlexaFluor 594 (111-586-045, Jackson ImmunoResearch, 1:500) или AlexaFluor 647 (711-606-152, Jackson ImmunoResearch, 1:1000). AT2-рецепторы детектировали антителами AT2-APC (FAB3659A, R&D Systems, 1:50), АПФ – используя антитела ACE (ab77990, Abcam, 1:100), с последующей окраской вторичными антителами DyLight 649 (715-495-150, Jackson ImmunoResearch, 1:500). Для иммунофенотипического анализа клетки окрашивали антителами против CD45 (№ 557748, BD Pharmingen, 1:250), CD73 (№ 550257, BD Pharmingen, 1:25), CD90 (№ 555597, BD Pharmingen,

1:25) и CD105 (№ 560819, BD Pharmingen, 1:100). В качестве отрицательных контролей использовали следующие контрольные изотипические антитела: кроличий изотипический IgG (10500C, Invitrogen, 1:170), мышинный IgG2b-APC (IC0041A, R&D Systems, 1:50), мышинный IgG (sc2025, Santa Cruz Biotechnology, 1:40), мышинный IgG1-PE-Cy5 (560819, BD, 1:100) и мышинный IgG1-RPE (X0928, Dako, 1:25). Окрашенные клетки анализировали с помощью проточного цитометра LSR Fortessa (BD Biosciences) и программы FACSDiva (BD Biosciences). Данные проточного цитометра анализировали с помощью программы FlowJo (FLOWJO, LLC).

Для выделения субпопуляций AT2⁻ и AT2⁺ МСК использовали метод сортировки клеток с активированной флуоресценцией (fluorescence-activated cell sorting, FACS). Клетки окрашивали антителами, как описано выше, а затем инкубировали с красителем 7-актиноаминомицином D (Cell Viability Solution, 555815, BD Pharmingen, США, 1:12,5). После чего живые клетки сортировали с помощью прибора BD FACSAria III (BD Pharmingen, США). Чистоту выделения оценивали с помощью повторного анализа отсортированных клеток на BD FACSAria III. Выделенные клетки лизировали для ОТ-ПЦР или культивировали в 48-луночном планшете для дальнейшей адипогенной дифференцировки.

2.5 Ca²⁺-imaging

Активность AT1-рецептора в ответ на воздействие Ang II оценивали по активации фосфолипазы C, приводящей к увеличению концентрации Ca²⁺ в цитоплазме. Концентрацию ионов Ca²⁺ определяли на единичных клетках с помощью красителя Fluo8 (ab142773, Abcam), интенсивность флуоресценции которого прямо пропорциональна концентрации Ca²⁺. МСК высаживали в среде культивирования на 24-луночные планшеты в низкой плотности, чтобы при активации рецепторов предотвратить межклеточные взаимодействия. Далее клетки окрашивали 4 мкМ Fluo8 в растворе Хэнкса с 20 мМ HEPES (ПанЭко) в течение 1 часа при 37 °C и помещали в свежий раствор Хэнкса с HEPES. Ca²⁺-ответы при добавлении Ang II и ингибитора AT1-рецептора измеряли для

единичных клеток с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti с камерой Andor iXon 897 (Andor Technology) при 490 нм поглощения и 525 нм испускания (объектив 10×). Клетки фотографировали с интервалом 1 сек., полученное видео анализировали в программах NIS-Elements (Nikon) и ImageJ (НИН, США). Для увеличения числа анализируемых клеток флуоресценцию одновременно измеряли в 36 полях зрения. Изменения концентрации цитоплазматического Ca^{2+} выражали относительно базового уровня Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$), который записывали в течение 5 минут перед началом эксперимента. Процент МСК с активными AT1-рецепторами подсчитывали как соотношение между числом клеток, формирующих Ca^{2+} -ответы, и общим числом клеток в поле зрения.

2.6 Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР (ОТ-ПЦР)

Тотальную РНК из клеток выделяли и очищали с помощью набора Direct-zol™ RNA MiniPrep или Direct-zol™ RNA MicroPrep (Zymo Research, США) – в зависимости от количества клеток в эксперименте. Все операции выполняли согласно инструкциям производителя. Обработку образцов ДНКазой I проводили на колонках. Концентрацию и качество РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo Scientific, США). Для дальнейшего анализа использовали РНК с соотношением 260/280 нм от 1,9 до 2,1. Первую цепь кДНК синтезировали, используя SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Life Technologies, США). Реакцию проводили с праймерами Oligo(dT)20, согласно инструкции производителя. Обратную транскриптазу инактивировали 15 мин. при 70°C. Количественный ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) проводили в 96-луночных планшетах с помощью прибора ДТ-96 (ДНК-технология, Россия). Каждый образец анализировали в трех повторностях, в реакциях по 25 мкл, с кДНК из расчета 75-100 нг начальной тотальной РНК на 1 реакцию ПЦР, 10 мкМ специфических праймеров (или 5 мкМ для REN, СЕВРβ) и смесью qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Амплификацию проводили по схеме: 3 минуты при 94 °C, а затем 40 циклов: 10 сек. 94 °C, 10 сек. 60 °C (или 64 °C для REN, СЕВРβ), 20

сек. 72 °C. Для анализа данных использовали программу RealTime_PCR v7.0 (ДНК-технология, Россия). Уровень экспрессии генов интереса рассчитывали относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства RPL13A методом сравнительного порогового C_t . Для ПЦР использовали следующие праймеры:

AGT, 176 bp, прямой ACCCTGGCTTTCAACACCTAC, обратный TGAGTCACCGAGAAGTTGTCC; REN, 112 bp, прямой CCGTGATCCTCACCAACTACA, обратный ACCCAAACATTGGACGAACCA; ACE, 194 bp, прямой TGGTGTGGAACGAGTATGCC, обратный GTCCTGAACCTTCTTTATGATCCG; PRCP, 119 bp, прямой GAAAAGCGGTCCACATTGTTC, обратный ATGGGCTGCATAAGTGAAGGG; AT1, 143 bp, прямой TTTCCTACCGCCCCTCAGAT, обратный TGAAGTGCTGCAGAGGAATGT; AT2, 181 bp, прямой CTGAGAGAACGAGTAAGCACAGA, обратный TAGTAGTGGCAAGGGTGGAGT; MAS1, 190 bp, прямой ACATCACCCACCTGTCTATCG, обратный AGGCACCTCTCCACACTAATG; MrgD, 175 bp, прямой GGAGTCAGCCCTAAACTATTCCAG, обратный CGCCAGGTTGAGGATATAGATGC; СЕВРβ, 189 bp, прямой CACAGCGACGAGTACAAGATCC, обратный CTTGAACAAGTTCCGCAGGGTG; Klf5, 136 bp, прямой CCCTTGCACATACACAATGC, обратный GGATGGAGGTGGGGTTAAAT; PPAR γ , 120 bp, прямой AGCCTCATGAAGAGCCTTC, обратный TCCGGAAGAAACCCTTGCA; Adiponectin, 113 bp, прямой GACCAGGAAACCACGACTCA, обратный TTTCACCGATGTCTCCCTTAGG; BDNF, 117 bp, прямой TAACGGCGGCAGACAAAAAGA, обратный TGCACTTGGTCTCGTAGAAGTAT; NGF, 140 bp, прямой TGTGGGTTGGGGATAAGACCA, обратный GCTGTCAACGGGATTTGGGT; GDNF, 185 bp, прямой AGAGACCACTGGCACTTGAC, обратный GTCAGCATTAATCCAGGACTACC; NTF3, 104 bp, прямой GAACTGCTGCGACAACAGAGA, обратный CCCACGTAATCCTCCATGAGA; NRTN, 187 bp, прямой TCAAAGTCAAAGGCCCCACA, обратный

GCCCTCTCGACACATCCAG; ARTN, 180 bp, прямой
 TGCGGATCCCAGCCTAAAAG, обратный ATGTGTCCTTCAAATGCTGTCC;
 PEDF, 192 bp, прямой CATCATTCACCGGGCTCTCTAC, обратный
 GGCCTGGTCCCATATGACTTTT; FGF2, 170 bp, прямой
 AGTGTGTGCTAACCGTTACCT, обратный ACTGCCCAGTTCGTTTCAGTG;
 NRG1, 247 bp, прямой CGGTGTCCATGCCTTCCAT, обратный
 GCGAGTTTCTTAACAGGCTCT; IGF-1, 133 bp, прямой
 GCTCTTCAGTTCGTGTGTGGA, обратный GCCTCCTTAGATCACAGCTCC;
 TGFA, 103 bp, прямой TGTAATCACCTGTGCAGCCTTT, обратный
 GTGGTCCGCTGATTTCTTCTCT; RPL13A, 185 bp, прямой
 CTCAAGGTCGTGCGTCTGAA, обратный ACGTTCTTCTCGGCCTGTTT.
 Праймеры подбирали с помощью программы Primer-BLAST (NCBI, США) или
 использовали праймеры из базы данных PrimerBank (The Massachusetts General
 Hospital, США). Праймеры анализировали на образование димеров в программе
 OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, США). Специфичность
 амплификации оценивали по электрофорезу продуктов ПЦР и кривым плавления.

2.7 Адипогенная дифференцировка

МСК растили до монослоя, затем культивировали в дифференцировочной
 среде AdvanceSTEM adipogenic differentiation medium (HyClone, GE Healthcare
 Life Sciences, США) с заменой среды на свежую 2 раза в неделю. Уровень мРНК
 генов адипогенеза в клетках измеряли с помощью количественного ПЦР в
 реальном времени через 7 дней после начала дифференцировки. Суммируя
 данные о транскрипционных факторах и других белках, активирующихся при
 адипогенной дифференцировке (см. главу 1.1.2 обзора литературы), мы выбрали
 четыре гена, по экспрессии которых оценивали адипогенез: два гена ранней
 стадии дифференцировки – CEBPB, Klf5 и два гена поздней стадии – PPAR γ ,
 Adipoq (ген адипонектина). Накопление жировых капель в клетках оценивали
 через 3 недели после начала дифференцировки. Клетки фиксировали 1 час в 4%
 растворе формальдегида (Panreac, Испания) на PBS, промывали dH₂O, 5 мин.

инкубировали в 60% изопропанолe, а затем заменяли его на раствор масляного красного О на 10 мин. Раствор масляного красного О готовили следующим образом: стоковый раствор 3 мг/мл в изопропанолe смешивали в соотношении 3:2 с водой, оставляли на 10 мин., затем фильтровали через бумажный фильтр и использовали для окраски клеток. После окраски масляным красным О клетки отмывали под водопроводной водой до прозрачного фона, промывали dH₂O и проводили окраску гематоксилином Майера (Dako, США) в течение 5 мин. Гематоксин затем также отмывали водопроводной водой. Окрашенные клетки анализировали на микроскопе Leica DMI6000B с камерой DFC420 C. В 10-ти случайных полях зрения (при увеличении 10×) для каждой экспериментальной точки с помощью программы MetaMorph 7.1 (Universal Imaging) оценивали процент клеток с яркими жировыми каплями.

2.8 Обработка МСК Ang II и ингибиторами к компонентам PAC

В работе использовали следующие реактивы: Ang II (Abcam), ингибитор АПФ эналаприлат (Abcam, 10 мкМ), ингибитор AT1-рецептора лозартан (Abcam, 1 мкМ), ингибитор AT2-рецептора PD123319 (Tocris, 1 мкМ). Ингибиторы во всех экспериментах добавляли за 30 мин - 1 час до добавления Ang II.

При измерении Ca²⁺-ответов проводили короткие серийные добавки Ang II без или с лозартаном. Клетки инкубировали с Ang II в течение 4-х минут, затем 3-5 раз отмывали раствором Хэнкса и после 5-минутного перерыва снова стимулировали Ang II. Оптимальную концентрацию Ang II определяли серийными разведениями гормона в интервале 0,1 нМ – 10 мкМ. Далее в экспериментах Ang II добавляли в концентрации 0,1 мкМ.

При адипогенной дифференцировке Ang II и ингибиторы добавляли при каждой смене дифференцировочной среды.

При оценке нейротрофической активности МСК в 70% монослое отмывали от сыворотки 3 раза по 5 минут раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия). Дальнейшее культивирование проводили в среде DMEM с 1 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия) и 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, без добавления FBS. МСК

инкубировали с Ang II и ингибиторами 1 час, затем дважды отмывали раствором Хэнкса и добавляли свежую среду DMEM без FBS. Уровень мРНК нейротрофических факторов и факторов роста в МСК измеряли через 5 часов после отмывки от Ang II (через 6 часов после начала обработки Ang II). Для экспериментов по оценке нейротрофической активности МСК кондиционированную среду собирали через 23 часа (через 1 сутки после начала обработки Ang II), добавляли FBS до 1% и наносили на дифференцированные клетки Neuro2A. Для подбора оптимальных условий проанализировали эффект инкубации с Ang II в течение 10 минут и 1 часа, а также кондиционирование среды в течение 24 часов и 48 часов.

2.9 Определение нейротрофической активности МСК

Клетки линии Neuro2A рассеивали в концентрации по 6 тысяч на лунку 24-луночного планшета в ростовой среде DMEM с 4,5 г/л глюкозы и 10% FBS. Через сутки среду культивирования меняли на среду с пониженным содержанием сыворотки (DMEM с 1% FBS) для стимуляции дифференцировки в псевдоуниполярные нейроны. Еще через сутки на дифференцированные депривацией Neuro2A наносили кондиционированную среду от МСК (каждый образец среды наносили в двух повторах). В качестве положительного контроля добавляли фактор роста нервов (NGF) мыши (50 нг/мл), в качестве отрицательного – среду DMEM с 1% FBS. Через три дня с помощью микроскопа Leica DMI6000B (камера DFC 350 FX, увеличение 5×) и программы MetaMorph 7.1 измеряли среднюю длину нейритов для 500-600 клеток в каждой экспериментальной точке. За нейрит считали отростки больше двух диаметров клетки.

2.10 Получение кондиционированной среды МСК для протеомного анализа секретируемых факторов

МСК, высаженные накануне в 80% плотности, помещали в CO₂-инкубаторе на шейкер. Затем проводили тщательную пятикратную отмывку клеток от сыворотки AdvanceSTEM Growth Supplement раствором Хэнкса (без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺) с добавлением MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Gibco). После заключительной отмывки раствор Хэнкса заменяли на бессывороточную среду роста Mesenchymal Stem Cell Basal Medium с MEM Non-Essential Amino Acids Solution. Далее клетки культивировали в стандартных условиях (5% CO₂, 37 °C, без шейкера) в течение 48 часов. После окончания инкубации кондиционированную среду собирали и для ингибирования протеаз добавляли в нее 100 мМ PMSF и 200 мМ ЭДТА до конечных концентраций 2 и 5 мМ, соответственно. Для удаления клеточного дебриса среду центрифугировали 15 минут при 200 RCF. Полученный супернатант фильтровали через 0,45 мкм фильтр (BD Falcon, США) и подвергали быстрой заморозке в жидком азоте. Замороженную кондиционированную среду передавали коллегам из лаборатории протеомного анализа ФНКЦ физико-химической медицины для анализа методами жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии.

2.11 Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводили с использованием МСК как минимум от трех разных доноров. Данные анализировали в программе SigmaPlot 12.5, используя критерий Шапиро-Уилка и ранговый однофакторный дисперсионный анализ (one way ANOVA on ranks) с критериями Краскела-Уоллиса, Стьюдента-Ньюмена-Кейлса, Данна или Манна-Уитни. Статистическую значимость определяли как $p < 0.05$. Данные приведены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего (standard error, SE).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Экспрессия локальной РАС в МСК жировой ткани человека *in vivo* и *in vitro*

Чтобы проанализировать экспрессию компонентов локальной РАС *in vivo*, жировую ткань забирали у здоровых доноров при абдоминальных хирургических операциях и проводили иммуногистохимическое окрашивание криосрезов ткани. Анализ флуоресцентного окрашивания срезов антителами против ангиотензиновых рецепторов показал, что клетки жировой ткани человека экспрессируют рецепторы к Ang II – AT1, AT2 и рецептор к Ang 1-7 – MAS1 (рис. 7). Наиболее представлен из них AT1-рецептор: он экспрессируется практически во всех клетках жировой ткани. AT2- и MAS1-рецепторы детектируются на гораздо более низком уровне. Это согласуется с ранее полученными данными о присутствии компонентов локальной РАС в жировой ткани и активной экспрессии AT1-рецептора [142].

Ранее локальную РАС в жировой ткани изучали преимущественно с помощью анализа экспрессии мРНК ангиотензиногена, ренина и других компонентов системы в линиях клеток преадипоцитов [181–183; 221]. Поэтому распределение рецепторов к Ang II внутри самой ткани описано не было. Для того чтобы установить, какие типы клеток в жировой ткани экспрессируют рецепторы к Ang II, мы провели двойное иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов жировой ткани. Совместно с рецепторами к Ang II мы окрасили стромальные клетки и клетки сосудистой стенки, которые соответствуют МСК *in vivo* (с помощью антител против маркеров CD90 и PDGFR β), а также эндотелий сосудов (с помощью антител против маркера CD31). Таким образом, по соэкспрессии рецепторов к Ang II и маркеров стромальных клеток, а также по их расположению относительно CD31⁺ эндотелиальных клеток сосудов мы могли судить о присутствии компонентов локальной РАС в МСК жировой ткани *in vivo*. Оказалось, что AT1-рецептор действительно соэкспрессируется в строме ткани с маркерами CD90 и PDGFR β , а также присутствует в клетках субэндотелиального слоя сосудов рядом с CD31⁺ эндотелиальными клетками (рис. 7 А-В). AT2-

рецептор также был обнаружен и в стромальных клетках, и в клетках сосудистой стенки (рис. 7 Г-Д).

Таким образом, мы показали, что клетки жировой ткани, экспрессирующие рецепторы к ангиотензиновым пептидам по локализации и наличию стромальных маркеров соответствуют МСК. При этом практически все стромальные клетки экспрессируют AT1-рецептор, а лишь часть из них – AT2-рецептор и MAS1-рецептор. Полученные результаты впервые позволили выявить экспрессию рецепторов ангиотензина в МСК *in vivo*. Экспрессия рецепторов позволила нам предположить, что функциональная активность МСК ЖТ, включая адипогенную дифференцировку и секреторную активность может регулироваться ангиотензиновыми пептидами *in vivo*.

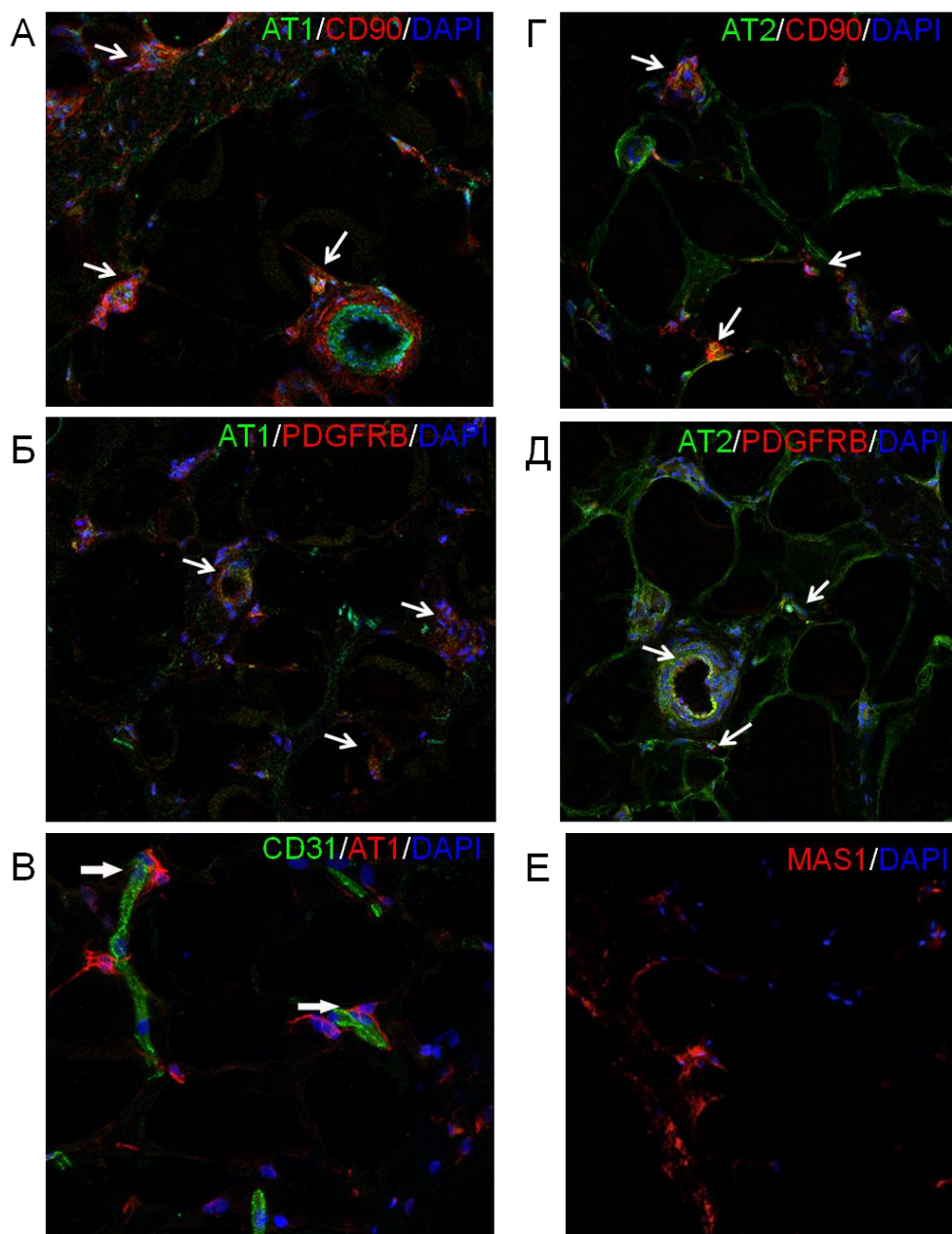


Рисунок 7. Экспрессия рецепторов к ангиотензиновым пептидам в клетках жировой ткани человека. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов жировой ткани антителами против AT1-рецептора (А, Б, В), AT2-рецептора (Г, Д), MAS1-рецептора (Е), стромальных маркеров CD90 (А, Г) и PDGFR β (Б, Д), эндотелиального маркера CD31 (В). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Белыми стрелками отмечены клетки с рецепторами к Ang II, располагающиеся в строме и в субэндотелиальном слое сосудов и соответствующие MCK ЖТ *in vivo*.

Чтобы описать локальную РАС в МСК более подробно, мы выделили МСК из жировой ткани и в последующих экспериментах изучали их *in vitro* в виде первичной культуры клеток. Экспрессию рецепторов к ангиотензину II и мембранного АПФ мы оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии и иммуноцитохимического окрашивания, а экспрессию ангиотензиногена и секретируемых форм ферментов, метаболизирующих ангиотензиновые пептиды – с помощью анализа кондиционированной среды. Совместно с коллегами из лаборатории протеомного анализа ФНКЦ физико-химической медицины мы проанализировали кондиционированную среду от МСК ЖТ методами жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. Оказалось, что среди белков, секретируемых МСК ЖТ, присутствуют классические компоненты локальной РАС: ангиотензиноген и секретируемая форма АПФ (табл. 1). Это подтверждает ранее полученные данные об экспрессии компонентов локальной РАС в первичных культурах МСК, выделенных из костного мозга и жировой ткани [143; 201; 205; 222].

Таблица 1. Компоненты РАС, секретируемые МСК ЖТ

Uniprot ACC#	Название белка	Встречаемость среди 10-ти образцов	Количество пептидов в образце, среднее $\pm$ SD	Участие в локальной РАС
P01019	ангиотензиноген (Agt)	1/10	9,00 $\pm$ 0	предшественник Ang II, Ang 1-7
P12821	АПФ (секретируемый)	1/10	2,00 $\pm$ 0	AngI $\rightarrow$ AngII
P42785	ангиотенгиназа С	5/10	3,40 $\pm$ 1,14	AngII $\rightarrow$ Ang1-7
P07858	катепсин В	10/10	21,3 $\pm$ 10,53	проперин $\rightarrow$ ренин
P07339	катепсин D	9/10	15,44 $\pm$ 8,29	Agt $\rightarrow$ AngI

Кроме того, мы показали, что МСК ЖТ секретируют такие протеазы, как ангиотенгиназа С (PRCP) и катепсины В и D, которые также могут быть участниками локальной РАС и способствовать синтезу различных ангиотензиновых пептидов (табл. 1). Так, ангиотенгиназа С расщепляет Ang II до Ang 1-7, катепсин D расщепляет ангиотензиноген до Ang I, а катепсин В может превращать неактивный предшественник проперин в активный фермент ренин.

Наличие в МСК таких неклассических компонентов РАС делает возможным формирование ангиотензиновых пептидов различными путями и позволяет более тонко регулировать функционирование локальной РАС.

С помощью иммуноцитохимического окрашивания и проточной цитофлуориметрии мы показали, что согласно с данными *in situ*, практически все МСК ЖТ в культуре экспрессируют AT1-рецептор к Ang II (рис. 8 А, Д). Процент клеток, экспрессирующих AT2-рецептор, значительно ниже: $5,7 \pm 1,7\%$, и сильно варьирует между донорами жировой ткани (рис. 8 Б, В, Е). Кроме того, практически все МСК экспрессируют мембранный АПФ (рис. 8 Г).

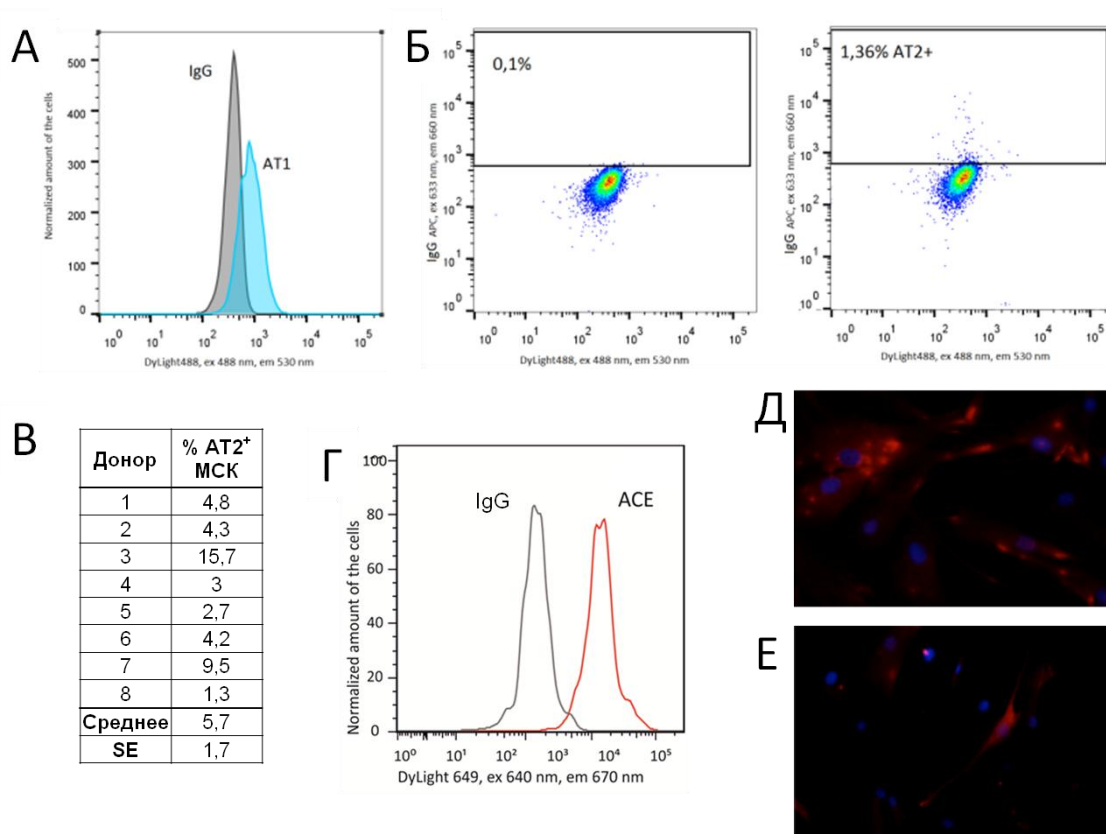


Рисунок 8. МСК ЖТ экспрессируют рецепторы к Ang II и мембранный АПФ *in vitro*. Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии (окраска на льду, А-Г) и иммуноцитохимического окрашивания (Д, Е). А, Д – окраска AT1-рецепторов; Б, Е – окраска AT2-рецепторов; В – процент AT2⁺-клеток в МСК различных доноров; Г – окраска мембранного АПФ (Angiotensin-converting enzyme - ACE).

Мы работали с первичной культурой стромальных клеток жировой ткани, в которой даже при повторном пассировании могут сохраняться кроветворные предшественники, клетки иммунной системы и другие клетки, выделенные из жировой ткани, но не являющиеся МСК. Чтобы удостовериться, что AT1-рецепторы в выделенной нами первичной культуре экспрессируются именно на МСК, мы провели двойное окрашивание AT1-экспрессирующих клеток с маркерами, характеризующими МСК ЖТ: CD73, CD90, CD105, CD45. С помощью проточной цитофлуориметрии мы показали, что все AT1⁺-клетки являются CD45⁻ и экспрессируют CD90 (99.9±0.1%), а 96.7±2% являются CD73⁺CD105⁺ (рис. 9). То есть все AT1-рецепторы экспрессируются на клетках, отвечающих критериям МСК ЖТ.

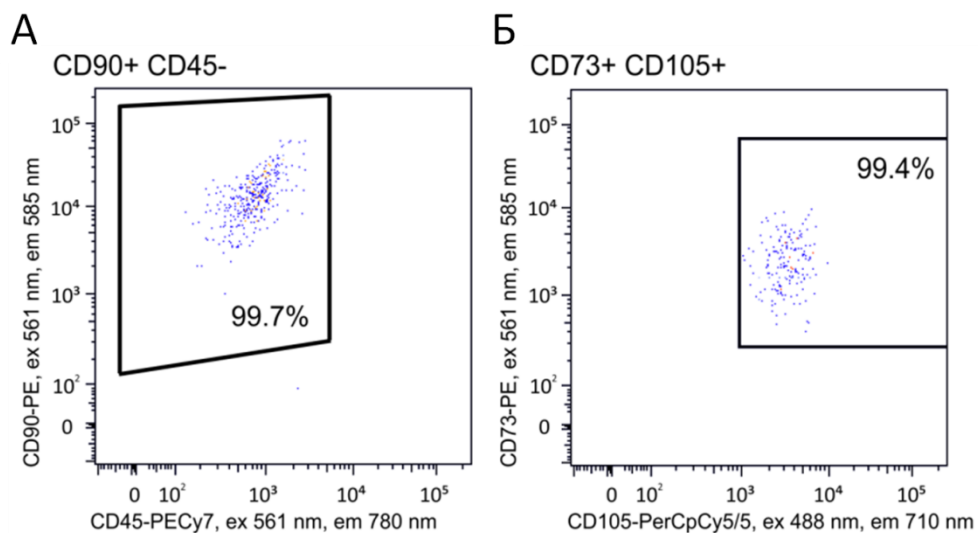


Рисунок 9. AT1⁺-клетки имеют CD73⁺CD90⁺CD105⁺CD45⁻ фенотип, присущий МСК. Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии. А – окраска AT1⁺-клеток антителами против CD90 и CD45. Б - окраска AT1⁺-клеток антителами против CD73 и CD105.

Таким образом, мы показали, что МСК ЖТ *in vitro* содержат все основные компоненты локальной РАС: ангиотензиноген, ферменты для синтеза ангиотензиновых пептидов и рецепторы к ним. При этом наблюдается выраженная гетерогенность МСК по экспрессии рецепторов к Ang II: практически все МСК содержат AT1-рецептор и лишь небольшая субпопуляция клеток

экспрессирует AT2-рецептор. Это согласуется с данными о преимущественном влиянии Ang II через AT1-рецептор за счет его более высокой представленности на клетках взрослого организма в сравнении с AT2-рецептором [142].

Чтобы проанализировать функциональность локальной РАС в МСК, мы определили, активен ли в них AT1-рецептор. Поскольку связывание Ang II с AT1-рецептором преимущественно вызывает активацию фосфолипазы C и выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо в цитоплазму [142], то активность рецептора мы оценивали по формированию в МСК Ca^{2+} -ответов. Для этого МСК нагружали красителем Fluo-8, интенсивность флуоресценции которого пропорциональна концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Затем проводили короткие серийные добавки Ang II с промежуточными отмывками и измеряли интенсивность флуоресценции единичных клеток. Чтобы определить оптимальную концентрацию гормона для активации AT1-рецепторов в нашей системе, мы добавляли Ang II в интервале 0,1 нМ - 10 мкМ с десятикратными разведениями. Оптимальными оказались концентрации 10 нМ и 0,1 мкМ Ang II (рис. 10), т.к. они вызывали формирование Ca^{2+} -ответов наибольшей амплитуды у наибольшего числа клеток. Поэтому в дальнейших экспериментах по кальциевой сигнализации и по влиянию РАС на функциональную активность МСК мы использовали Ang II в концентрации 0,1 мкМ. Полученные нами значения рабочих концентраций Ang II в интервале 10 нМ-0,1 мкМ сходны с концентрациями, которые были использованы в других исследованиях по влиянию Ang II на функциональные свойства МСК [214; 223]. Это на несколько порядков выше физиологических концентраций Ang II (около 40 пкМ), определяемых в периферической крови и локально в тканях [224–226]. Вероятно, большие концентрации Ang II, которые запускают физиологический ответ на гормон, присутствуют непосредственно в месте его формирования из предшественников. В подтверждение этому говорят данные Liu и коллег [214], которые показали, что экзогенный Ang II довольно быстро расщепляется локальными пептидазами, секретируемыми МСК, поэтому концентрация Ang II уже в течение часа после добавления возвращается к физиологической. То есть,

по всей видимости, влияние больших концентраций гормона на клетки является кратковременным.

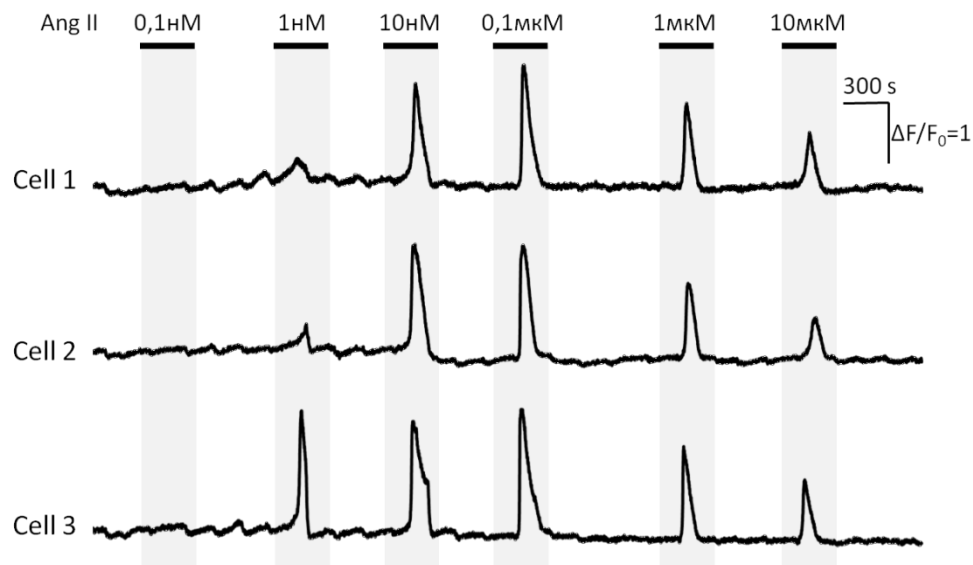


Рисунок 10. Определение оптимальной концентрации Ang II для активации AT1-рецепторов. К Fluo8-нагруженным МСК добавляли Ang II в интервале концентраций 0,1 нМ – 10 мкМ. Репрезентативные данные записей Ca^{2+} -ответов.

Ранее о кальциевой сигнализации AT1-рецепторов на МСК были опубликованы лишь отрывочные данные, в которых показывали формирование Ca^{2+} -ответов при добавлении Ang II, но не оценивали их воспроизводимость и процент отвечающих клеток [207]. Мы проводили эксперименты с повторными добавками 0,1 мкМ Ang II, используя большой пул клеток. Это позволило нам определить, что единичные Ca^{2+} -ответы формируются в $48,5 \pm 9,7\%$ МСК. То есть примерно половина популяции МСК содержит функционально активные AT1-рецепторы. При этом повторно на добавления Ang II отвечают только $5,2 \pm 2,7\%$ клеток. Все специфические Ca^{2+} -ответы блокируются ингибитором AT1-рецепторов лозартаном, то есть формируются при связывании добавляемого Ang II именно с AT1-рецепторами (рис. 11). Наблюдаемое нами снижение процента отвечающих клеток при повторных добавлениях Ang II, вероятно, обусловлено тем, что после первого связывания с лигандом большинство AT1-рецепторов интернализуется. Это хорошо согласуется с данными литературы, которые

характеризуют AT1-рецептор как классический семидоменный рецептор, ассоциированный с G-белками, легко подвергающийся интернализации [227]. Однако интересно, что при повторных добавках Ang II число Ca^{2+} -ответов становилось на порядок меньше, но они не исчезали совсем. То есть, по всей видимости, AT1-рецепторы на МСК функционируют гетерогенно и часть из них по каким-то причинам не интернализуется.

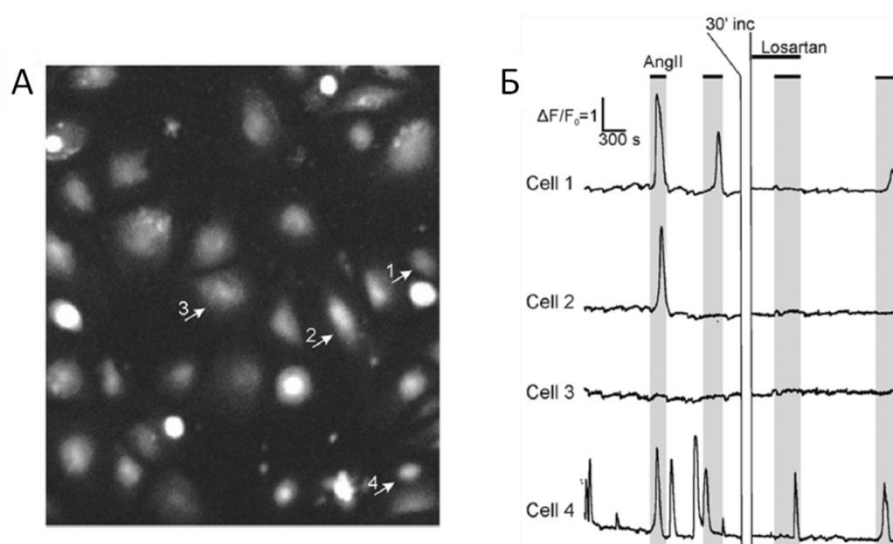


Рисунок 11. МСК ЖТ экспрессируют функционально активные AT1-рецепторы. Репрезентативные данные по флуоресценции Fluo8-нагруженных МСК (А) и записей Ca^{2+} -ответов (Б) после добавления Ang II и антагониста AT1-рецепторов лозартана.

Чтобы рассмотреть вопрос интернализации рецепторов более подробно, с помощью проточной цитофлуориметрии мы сравнили окрашивание антителами AT1-рецепторов на льду, в условиях ингибирования интернализации, и при комнатной температуре – в условиях ее активации (рис. 12). Оказалось, что окрашивание при комнатной температуре никак не влияет на представленность AT2-рецепторов (рис. 12 А, В), но действительно вызывает интернализацию практически всех AT1-рецепторов (рис. 12 Б, Г). При этом есть субпопуляция МСК, в которой AT1-рецепторы не интернализуются и остаются стабильно экспонированными на поверхности клеток. Процент AT1-стабильно экспрессирующих МСК варьирует между донорами, но в среднем составляет

$2,8 \pm 0,9\%$ (рис. 12 Д) и близок к проценту МСК, экспрессирующих AT2-рецептор ($5,7 \pm 1,7\%$).

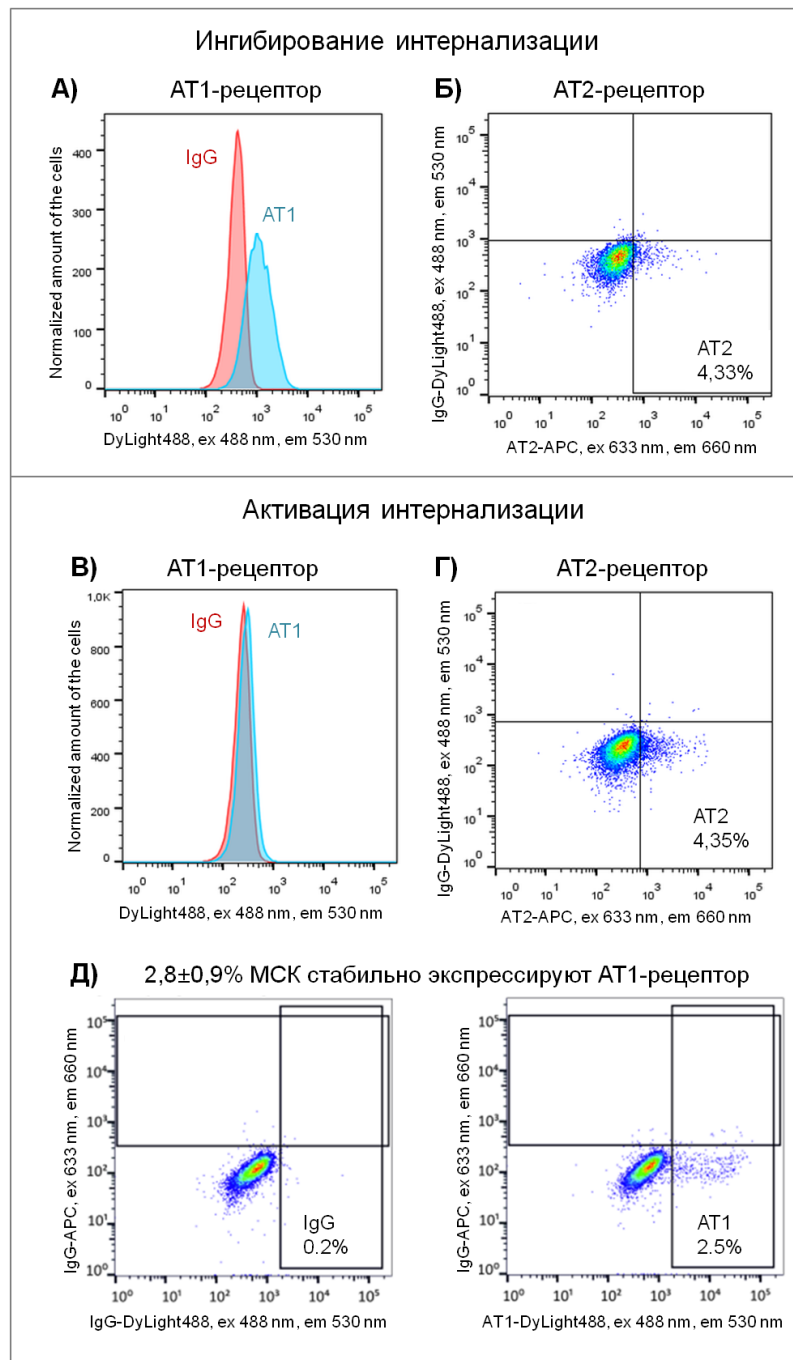


Рисунок 12. Сравнение окраски рецепторов к Ang II при ингибировании интернализации и при её активации. Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии. Ингибирование интернализации – окраска на льду, активация интернализации – окраска при комнатной температуре.

Далее мы провели двойное окрашивание АТ1- и АТ2-рецепторов в условиях активации интернализации и с помощью проточной цитофлуориметрии проанализировали их соэкспрессию. Оказалось, что все АТ1-стабильно экспрессирующие МСК соэкспрессируют АТ2-рецептор (рис. 13 Б, Г, Д). Причем, верно и обратное: АТ2-рецепторы экспрессируются только на АТ1-стабильно экспрессирующих МСК (рис. 13 В, Г). То есть АТ1-стабильно экспрессирующие МСК соответствуют АТ2⁺-субпопуляции. По данным литературы АТ1-рецепторы могут формировать гетеродимеры с АТ2-рецепторами, что влияет на их функциональную активность [169; 170]. Возможно, в таких гетеродимерах АТ2-рецептор блокирует интернализацию АТ1-рецепторов и именно поэтому АТ1-рецептор стабильно экспонирован на мембране только тех МСК, которые соэкспрессируют АТ2-рецептор. Далее мы будем описывать АТ1-стабильно экспрессирующие МСК как АТ2⁺.

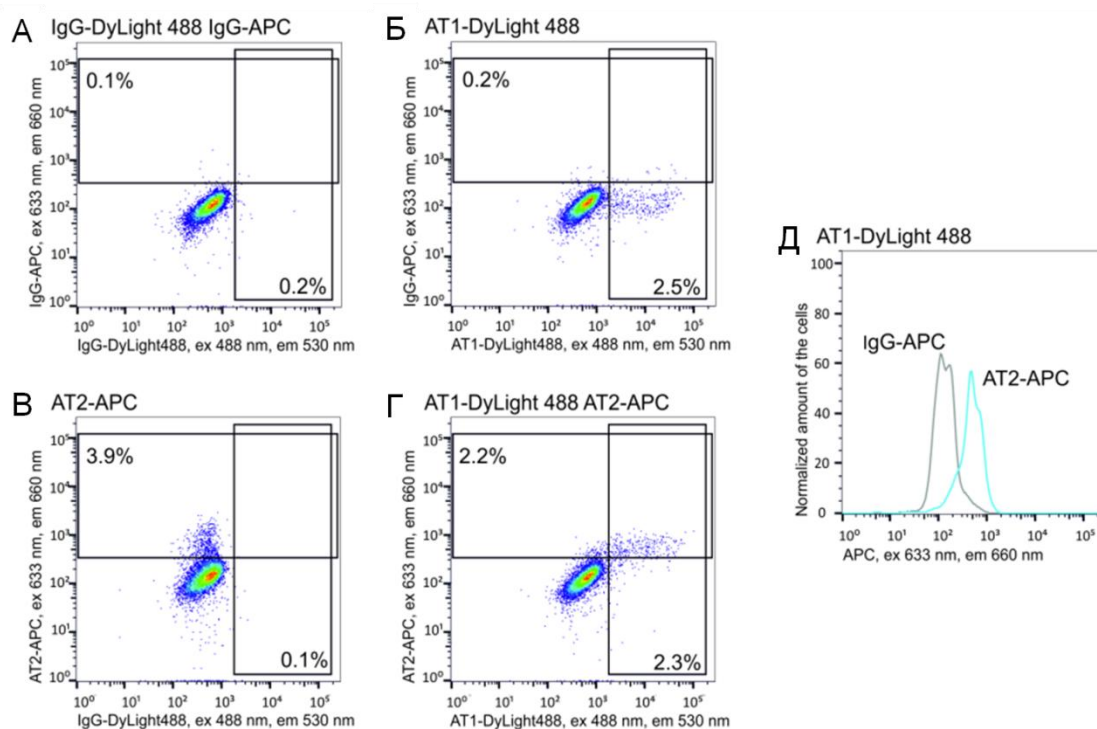


Рисунок 13. АТ1-рецептор не интернализуется на АТ2⁺ МСК. Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии. Окрашка при комнатной температуре. А – изотипический контроль IgG-APC, IgG-DyLight 488; Б – окрашка АТ1-рецепторов; В – окрашка АТ2-рецепторов; Г – двойная окрашка АТ1- и АТ2-рецепторов; Д – сравнение одиночной окрашки АТ1-

рецепторов (серый) и двойной окраски AT1- и AT2-рецепторов (голубой), показаны только AT1⁺-клетки.

Большинство работ по изучению ренин-ангиотензиновой системы в МСК проводилось на тотальной популяции клеток. Поэтому не было изучено, экспрессируются ли все ее компоненты на каком-то одном типе клеток, или же она экспрессирована гетерогенно. Для того, чтобы проанализировать гетерогенность экспрессии РАС в МСК жировой ткани, мы изучили экспрессию различных ее компонентов на AT2⁺-МСК. С помощью клеточного сортера мы выделили субпопуляции AT2⁺- и AT2⁻-МСК и методами обратной транскрипции и количественного ПЦР в реальном времени (количественного ОТ-ПЦР) сравнили в них экспрессию мРНК компонентов РАС. Помимо этого, методом проточной цитофлуориметрии мы сравнили в этих субпопуляциях экспрессию мембранного АПФ. Оказалось, что экспрессия мРНК ангиотензиногена, ренина, АПФ ангиотенгиназы С, необходимых для синтеза локальных ангиотензиновых пептидов, в этих двух субпопуляциях одинакова (рис. 14 А). Кроме того, все МСК: и AT2⁺, и AT2⁻, экспрессируют мембранный АПФ (рис. 14 В). Экспрессия же AT1-, AT2-, MAS1- и MrgD-рецепторов в AT2⁺ МСК более чем в 4 раза выше экспрессии этих рецепторов в AT2⁻-субпопуляции (рис. 14 Б). То есть практически все МСК ЖТ экспрессируют компоненты локальной РАС, но субпопуляция AT2⁺ обогащена рецепторами к ангиотензиновым пептидам.

Таким образом, мы показали, что МСК жировой ткани экспрессируют все основные компоненты локальной РАС, необходимые для синтеза и функционирования локальных ангиотензиновых пептидов. При этом мы впервые показали, что РАС в МСК гетерогенна по экспрессии ангиотензиновых рецепторов. И есть субпопуляция AT2⁺ МСК, обогащенная рецепторами к ангиотензиновым пептидам, в которой стабильно экспрессируется AT1-рецептор. Вероятно, что Ang II по-разному влияет на функциональные свойства МСК в зависимости от того, какие рецепторы они экспрессируют. Поэтому далее мы

рассматривали функционирование локальной РАС в МСК ЖТ с точки зрения гетерогенности экспрессии рецепторов.

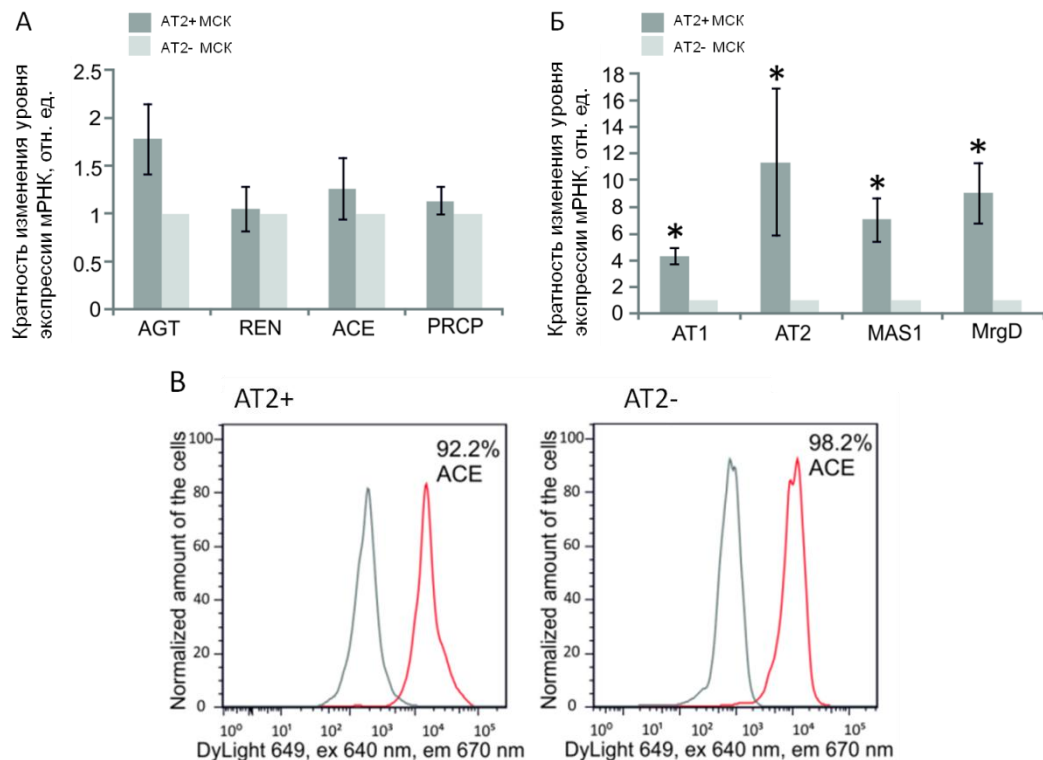


Рисунок 14. Экспрессия компонентов РАС в субпопуляции AT2⁺ МСК, стабильно экспрессирующих AT1-рецептор. AT2⁺ – МСК, экспрессирующие AT2-рецептор и стабильно экспрессирующие AT1-рецептор; AT2⁻ – МСК без AT2-рецептора, в которых AT1-рецептор интернализуется. А – количественный ОТ-ПЦР ангиотензиногена (AGT), ренина (REN), АПФ (ACE), ангиотензины С (PRCP). Б – количественный ОТ-ПЦР рецепторов к ангиотензиновым пептидам (AT1, AT2, MAS1, MrgD). * $p < 0.05$ по сравнению с AT2⁻ МСК (ранговый дисперсионный анализ по критерию Краскела-Уоллиса и непараметрическому критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса). В – анализ экспрессии АПФ методом проточной цитофлуориметрии, репрезентативный график. Серый – контроль, IgG-DyLight 649; красный – окраска на АПФ, ACE-DyLight 649.

3.2 Влияние Ang II на адипогенную дифференцировку МСК жировой ткани

Мы подробно охарактеризовали экспрессию компонентов локальной РАС в МСК жировой ткани и выявили гетерогенность в представленности ангиотензиновых рецепторов. Далее мы проанализировали влияние РАС на функционирование МСК. И в первую очередь рассмотрели влияние Ang II на МСК как на прогениторные клетки жировой ткани, которые являются предшественниками адипоцитов. Как уже упоминалось ранее (см. главу 1.3.3), данные о влиянии Ang II на адипогенную дифференцировку противоречивы и конкретный эффект Ang II на адипогенез, по-видимому, необходимо рассматривать отдельно для каждого типа клеток и условий дифференцировки [6; 182; 200–203]. Поэтому мы проверили, как Ang II влияет на адипогенез МСК жировой ткани именно в наших условиях. Для этого мы провели дифференцировку общей популяции МСК в адипоциты в присутствии 0,1 мкМ экзогенного Ang II. Через 1 неделю после начала дифференцировки с помощью количественного ОТ-ПЦР мы проанализировали экспрессию мРНК раннего маркера адипогенеза CEBP β и поздних маркеров адипогенеза PPAR γ и адипонектина. Оказалось, что Ang II снижает экспрессию всех проанализированных маркеров адипогенеза (рис. 15).

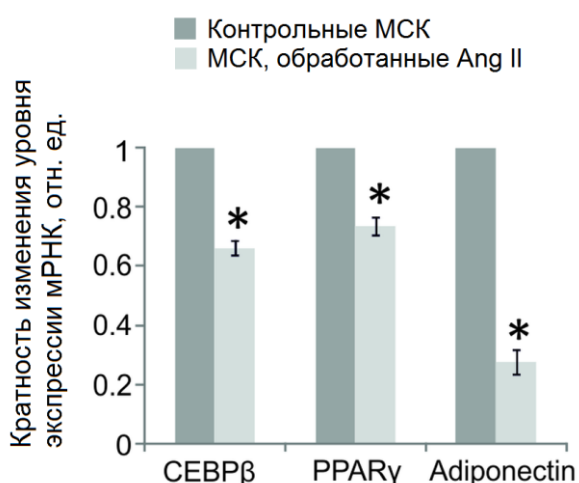


Рисунок 15. Ang II ингибирует адипогенную дифференцировку МСК ЖТ. Количественный ОТ-ПЦР маркеров адипогенеза (CEBP β , PPAR γ и адипонектина) мРНК МСК, дифференцированных в адипоциты без Ang II (контрольные МСК)

или в присутствии Ang II (МСК, обработанные Ang II). * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными МСК (ранговый дисперсионный анализ, критерий Манна-Уитни).

Таким образом, мы показали, что экзогенный Ang II ингибирует адипогенную дифференцировку МСК жировой ткани. Это согласуется с данными большинства ранее опубликованных работ, в которых изучалась дифференцировка преадипоцитов и МСК жировой ткани [6; 182; 200; 202]. Однако во всех этих экспериментах оценивался лишь усредненный эффект гормона на общую популяцию клеток. Учитывая выраженную гетерогенность МСК в целом и выявленную нами гетерогенность именно локальной РАС этих клеток, мы предположили, что $AT2^+$ -МСК, обогащенные рецепторами к ангиотензиновым пептидам, будут дифференцироваться в адипоциты иначе, чем вся популяция МСК. И предположили, что Ang II будет еще сильнее снижать или вообще блокировать адипогенную дифференцировку $AT2^+$ -субпопуляции МСК. Чтобы проверить это, мы выделили $AT2^+$ и $AT2^-$ МСК с помощью клеточного сортера, индуцировали в них адипогенную дифференцировку без добавления экзогенного Ang II и сравнили экспрессию мРНК маркеров адипогенеза, а также накопление жировых капель. Однако в противоположность нашим предположениям, мы обнаружили, что через неделю после начала дифференцировки в $AT2^+$ МСК в сравнении с $AT2^-$ -субпопуляцией достоверно выше экспрессия маркеров адипогенеза: как ранних – $CEBP\beta$ и $Klf5$, так и поздних – $PPAR\gamma$ и адипонектина (рис. 16 А). Кроме того, через три недели дифференцировки в $AT2^+$ -МСК по сравнению с субпопуляцией без $AT2^-$ -рецепторов образуется большее число крупных жировых капель, ярко окрашиваемых масляным красным О (рис. 16 Б). То есть субпопуляция $AT2^+$ МСК, на которой сосредоточены рецепторы к ангиотензиновым пептидам, наоборот, быстрее дифференцируется в адипоциты, чем остальные МСК. По данным некоторых исследователей, экспрессия компонентов локальной РАС изменяется при адипогенезе. Так, в работе Matsushita и коллег было обнаружено, что при адипогенной дифференцировке МСК костного мозга повышается

экспрессия ренина и AT2-рецептора [201]. А увеличение экспрессии ангиотензиногена некоторыми авторами даже считается маркером адипогенной дифференцировки [4; 228; 229]. Поэтому нельзя исключить, что AT2⁺ МСК жировой ткани дифференцируются в адипоциты быстрее, поскольку изначально находятся на более поздней стадии коммитирования, чем AT2⁻ МСК.

Для того, что определить, являются ли AT2⁺ МСК преддифференцированными в адипогенном направлении, мы выделили с помощью клеточного сортера AT2⁺ и AT2⁻ субпопуляции и сравнили в них экспрессию маркеров адипогенеза без индукции дифференцировки. Экспрессию адипонектина в этом случае мы не оценивали, т.к. он является самым поздним маркером дифференцировки и в преадипоцитах не экспрессируется [230]. мРНК же таких маркеров, как CEBP β , Klf5 и PPAR γ , детектируются и в недифференцированных МСК, но после индукции дифференцировки их уровень экспрессии сильно возрастает. Оказалось, что уровень экспрессии мРНК CEBP β , Klf5 и PPAR γ между AT2⁺-субпопуляцией и МСК без AT2-рецептора одинаков (рис. 16 В). То есть МСК, обогащенные рецепторами к ангиотензиновым пептидам, не являются преддифференцированными в адипогенном направлении.

Таким образом, мы идентифицировали в МСК жировой ткани субпопуляцию AT2⁺-клеток, обогащенную рецепторами к ангиотензиновым пептидам (AT1, AT2, MAS1, MrgD), которая отличается по своим функциональным свойствам и обладает повышенным адипогенным потенциалом. При этом AT2⁺-МСК не являются преддифференцированными в адипоциты. Поскольку описанные выше эксперименты по дифференцировке МСК в адипоциты мы проводили без добавления экзогенного Ang II, то вероятно, что свойства AT2⁺ МСК отличаются за счет влияния на них локального Ang II.

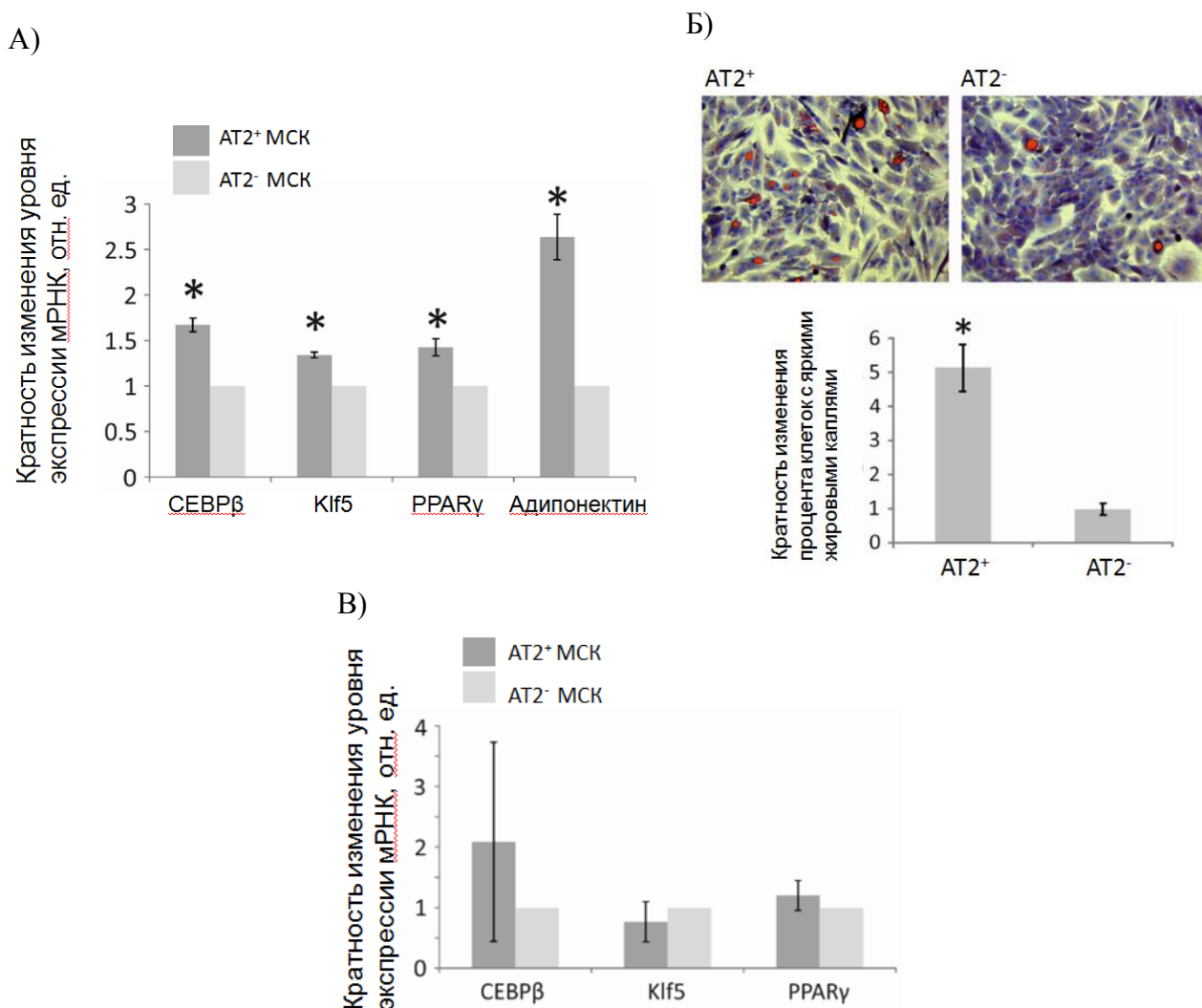


Рисунок 16. AT2⁺ МСК обладают повышенным адипогенным потенциалом. А – количественный ОТ-ПЦР маркеров адипогенеза (CEBPβ, Klf5, PPARγ и адипонектина) мРНК субпопуляции AT2⁺ МСК, дифференцированных в адипоциты. * - $p < 0,05$ по сравнению с AT2⁻ МСК (ранговый дисперсионный анализ по критерию Краскела-Уоллиса и непараметрическому критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса). Б – репрезентативное окрашивание дифференцированных субпопуляций МСК масляным красным О. Красный – жировые капли (масляный красный О), синий – ядра (гематоксилин). 20X. Процент AT2⁺ МСК с яркими жировыми каплями выражен относительно AT2⁻ МСК. * - $p < 0,05$ по сравнению с AT2⁻ МСК (ранговый дисперсионный анализ по критерию Краскела-Уоллиса и непараметрическому критерию Данна). В – количественный ОТ-ПЦР маркеров адипогенеза (CEBPβ, Klf5, PPARγ) мРНК недифференцированных

субпопуляций МСК. Статистически значимых отличий нет (ранговый дисперсионный анализ, критерий Манна-Уитни).

Чтобы проверить, влияет ли локальный Ang II на адипогенез МСК жировой ткани, мы провели адипогенную дифференцировку тотальной популяции МСК в присутствии различных ингибиторов: ингибитора АПФ эналаприлата, снижающего уровень образования локального Ang II, и ингибиторов AT1- и AT2-рецепторов лозартана и PD123319. Оказалось, что ингибирование АПФ и AT1-рецепторов усиливают экспрессию поздних маркеров адипогенеза – PPAR γ и адипонектина (рис. 17, эналаприлат и лозартан), а блокирование AT2-рецепторов, наоборот, снижает их экспрессию (рис. 17, PD123319).

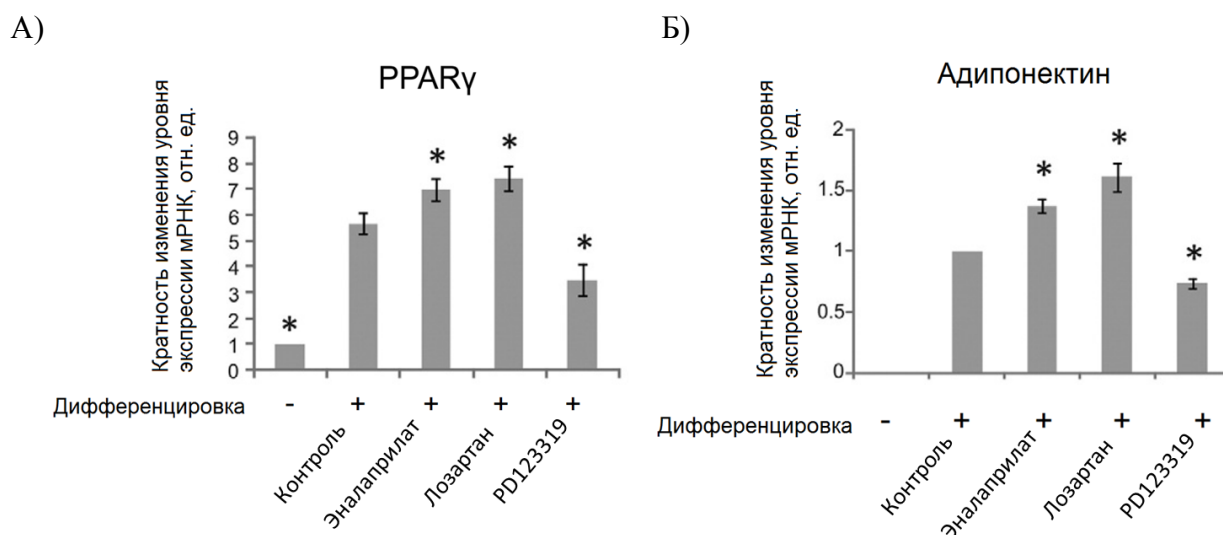


Рисунок 17. Влияние локального Ang II на адипогенную дифференцировку МСК ЖТ. Количественный ОТ-ПЦР мРНК от МСК, дифференцированных в присутствии ингибиторов к АПФ, AT1- и AT2-рецепторам. А – экспрессия PPAR γ , нормализация на недифференцированные МСК, Б – экспрессия адипонектина, нормализация на дифференцированный контроль, т. к. в недифференцированных МСК он не экспрессируется. Эналаприлат – дифференцировка в присутствии ингибитора АПФ, лозартан – в присутствии ингибитора AT1-рецепторов, PD123319 – в присутствии ингибитора AT2-рецепторов. * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными дифференцированными МСК (тест Шапиро-Уилка на нормальность

распределения, критерий Стьюдента-Ньюмена-Кейлса).

То есть локальный Ang II действительно влияет на дифференцировку МСК жировой ткани в адипоциты. Это согласуется с данными Matsushita и коллег, которые анализировали влияние локального Ang II на адипогенную дифференцировку МСК, выделенных из костного мозга [201]. О том, через какой рецептор локальный Ang II влияет на адипогенез до сих пор есть ряд противоречивых данных, поскольку это может зависеть от типа изучаемых прогениторных клеток, от факторов, используемых для индукции дифференцировки и от конкретных ее условий: частоты смены среды, чередования компонентов и т.д. [143]. В нашей системе ингибиторный анализ показал, что локальный Ang II ингибирует адипогенез МСК жировой ткани через AT1-рецептор и активирует через AT2-рецептор. Вероятно, это обуславливает свойства AT2⁺-МСК, подтверждая, что они обладают повышенным адипогенным потенциалом за счет влияния на них локального Ang II через AT2-рецептор. Кроме того, такие отличные от всей остальной популяции МСК функциональные свойства для AT2⁺-клеток могут быть обусловлены формированием гетеродимеров между AT1- и AT2-рецепторами. Поскольку есть данные о том, что в составе AT2-AT1 гетеродимеров AT2-рецептор подавляет функциональную активность AT1-рецепторов [169; 170]. Вероятно, именно это приводит к тому, что AT2⁺-МСК в противоположность всей остальной популяции имеют повышенный адипогенный потенциал.

3.3 Влияние Ang II на секреторную активность МСК жировой ткани

Мы показали, что Ang II влияет на адипогенную дифференцировку МСК жировой ткани – главных предшественников адипоцитов. Другая важнейшая функция МСК в обновлении жировой ткани: секреция факторов роста, поддерживающих васкуляризацию и иннервацию. Как уже упоминалось выше (см. главу 1.3.3), было показано, что МСК стимулируют ангиогенез за счет секреции ряда ангиогенных факторов, в том числе VEGF [231], а регенерацию

нервов - за счет секреции BDNF [98]. При этом уже были проведены некоторые исследования по изучению влияния Ang II на секреторные свойства МСК. Показано, что Ang II усиливает ангиогенные свойства МСК за счет активации экспрессии и секреции VEGF через AT1-рецептор [214]. Влияние же Ang II на нейротрофические свойства МСК (на секрецию нейротрофических факторов) до начала этой работы изучено не было.

Для определения нейротрофических свойств МСК мы использовали модель нейритогенеза с клетками мышечной нейробластомы линии Neuro2A, которые в присутствии факторов роста формируют нейриты. По средней длине образующихся нейритов можно судить о нейротрофической активности добавленных факторов. В такой модельной системе мы проанализировали влияние Ang II на нейротрофическую активность МСК. МСК инкубировали в присутствии 0,1 мкМ Ang II, после чего клетки отмывали и помещали в свежую среду роста. Затем кондиционированную среду собирали и наносили на дифференцированные депривацией клетки Neuro2A. Далее нейротрофические факторы роста, присутствующие в кондиционированной среде от МСК, стимулировали рост нейритов.

Чтобы подобрать оптимальные условия эксперимента мы сравнили предобработку МСК Ang II в течение 10 минут и в течение 1 часа, а также два времени кондиционирования среды: 24 часа и 48 часов. Во всех экспериментах МСК предобрабатывали 0,1 мкМ Ang II, т.к. эта концентрация гормона была оптимальна для функционирования ангиотензиновых рецепторов (см. главу 3.1, рис. 10). Оказалось, что при инкубации Neuro2A с кондиционированной средой от МСК, необработанных Ang II (рис. 18, Конд среда), длина формирующихся нейритов значительно выше, чем при инкубации с контрольной некондиционированной средой (рис. 18, К-). При этом кондиционирование среды в течение 24 и 48 часов по эффектам на рост нейритов практически не отличается. Предобработка МСК Ang II в течение 10 минут (рис. 18, Ang II 10 мин) не влияет на способность МСК стимулировать рост нейритов. Предобработка же МСК Ang II в течение 1 часа (рис. 18, Ang II 1 час) повышает способность МСК

стимулировать рост нейритов. При этом наибольший эффект от предобработки Ang II наблюдается при последующем кондиционировании среды в течение 24 часов. Поэтому в дальнейших экспериментах мы проводили предобработку МСК 0,1 мкМ Ang II в течение 1 часа, затем отмывали гормон, через 1 сутки кондиционированную среду от МСК наносили на Neuro2A и через 3-е суток оценивали рост нейритов.

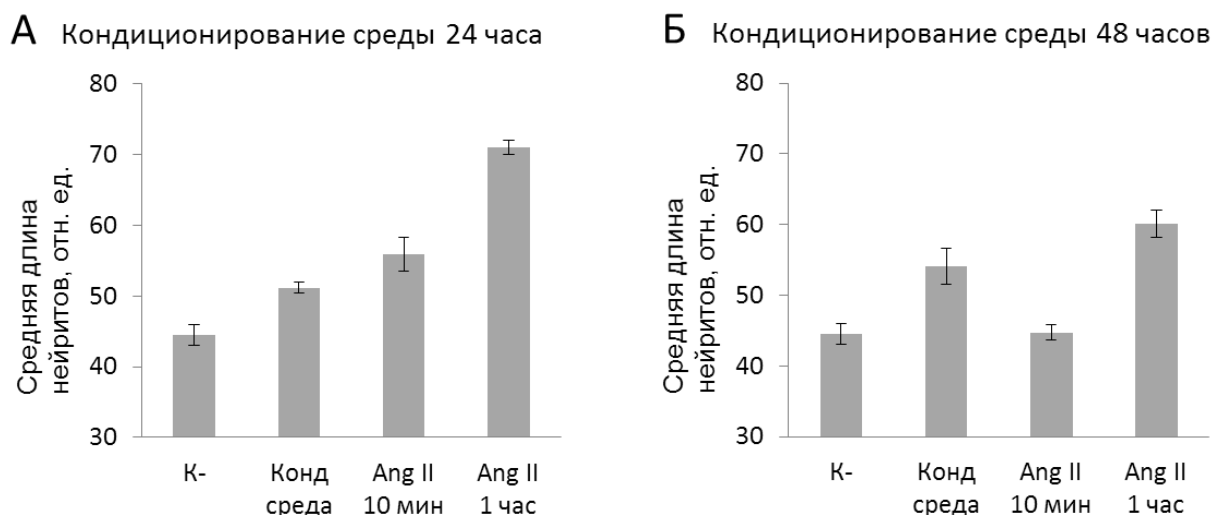


Рисунок 18. Влияние среды МСК на рост нейритов в культуре клеток нейробластомы линии Neuro2A при различных условиях предобработки ангиотензином II и кондиционировании среды. «К-» - отрицательный контроль, «Конд среда» – формирование нейритов в присутствии кондиционированной среды МСК, «Ang II» - формирование нейритов в присутствии кондиционированной среды МСК, предобработанных Ang II. Предобработку Ang II проводили в течение 10 минут и в течение 1 часа. После предобработки гормоном среду кондиционировали в течение 24 часов и в течение 48 часов.

Мы проанализировали влияние Ang II на способность кондиционированной среды от МСК стимулировать рост нейритов в подобранных выше условиях. Оказалось, что при инкубации Neuro2A с кондиционированной средой от МСК, не обработанных Ang II, длина формирующихся нейритов в 1,3 раза больше, чем при инкубации с контрольной некондиционированной средой. Предобработка

Ang II достоверно повышает способность МСК стимулировать рост нейритов (рис. 19). При этом наблюдаемый эффект от Ang II значительный и по силе близок к влиянию NGF (положительный контроль). Таким образом, мы показали, что Ang II усиливает нейротрофическую активность МСК. Это согласуется с данными о влиянии Ang II на процессы нейрорегенерации: он активирует пролиферацию нейрональных стволовых клеток [232], стимулирует нейрогенез в гиппокампе [233] и уменьшает степень повреждений при травмах головного и спинного мозга [144; 219]. Полученные нами данные говорят в пользу того, что Ang II стимулирует нейрорегенерацию не только напрямую - за счет влияния на клетки нервной системы, но и косвенно: через активацию секреторных свойств МСК.

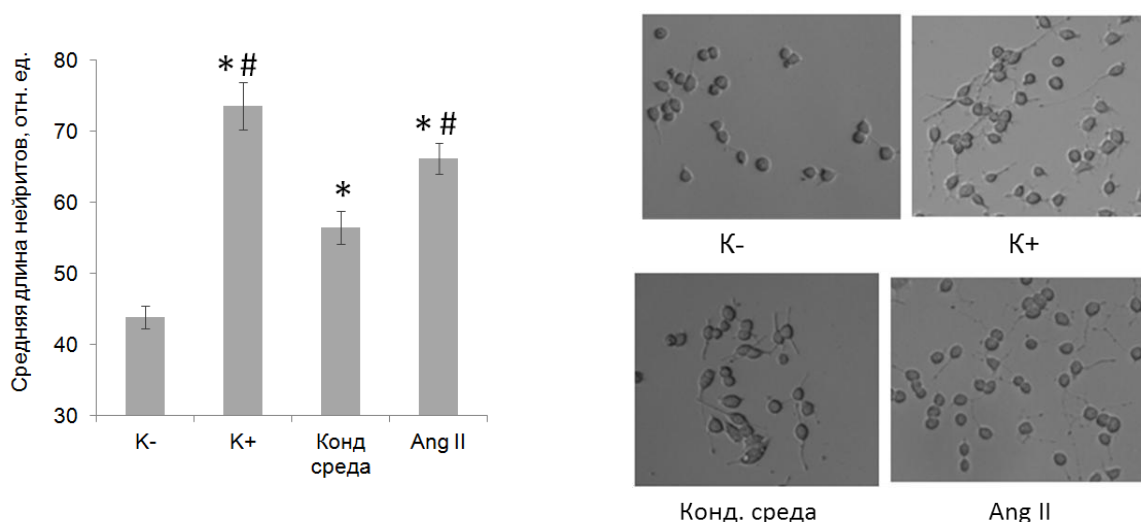


Рисунок 19. Влияние Ang II на способность МСК стимулировать рост нейритов в культуре клеток нейробластомы линии Neuro2A. «K-» - отрицательный контроль, «K+» - положительный контроль (NGF, 50 нг/мл), «Конд среда» - формирование нейритов в присутствии кондиционированной среды МСК, «Ang II» - формирование нейритов в присутствии кондиционированной среды МСК, предобработанных Ang II. * - $p < 0,05$ по сравнению с K-, # - $p < 0,05$ по сравнению с Конд средой (ранговый дисперсионный анализ по критерию Краскела-Уоллиса и непараметрическому критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса).

Мы предположили, что стимулирующий эффект Ang II на рост нейритов обусловлен его влиянием на экспрессию в МСК нейротрофических факторов и оценили их уровни мРНК через 6 часов после предобработки гормоном. Известен широкий спектр нейротрофических факторов и факторов роста, повышающих выживаемость нервных волокон при повреждениях, а также способствующих прорастанию новых аксонов и дифференцировке новых нервных клеток. Мы проанализировали наиболее значимые из них. Оказалось, что Ang II в 2 и более раз стимулирует в МСК экспрессию нейротрофического фактора мозга (BDNF), глиального нейротрофического фактора (GDNF), нейротрофина-3 (NTF3), нейртурина (NRTN), артемина (ARTN), фактора роста пигментного эпителия (PEDF), основного фактора роста фибробластов (FGF2), нейрегулина (NRG1), инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) и трансформирующего фактора роста альфа (TGFA). Для фактора роста нервов (NGF) значимого изменения в экспрессии после воздействия Ang II мы не наблюдали (рис. 20). Таким образом, Ang II усиливает нейротрофические свойства МСК за счет активации экспрессии в них ряда нейротрофических факторов и факторов роста. Подобные данные были получены ранее Namsolleck и коллегами [144] на первичных нейронах: активация AT₂-рецептора в их работе индуцировала экспрессию BDNF и других нейротрофических факторов.

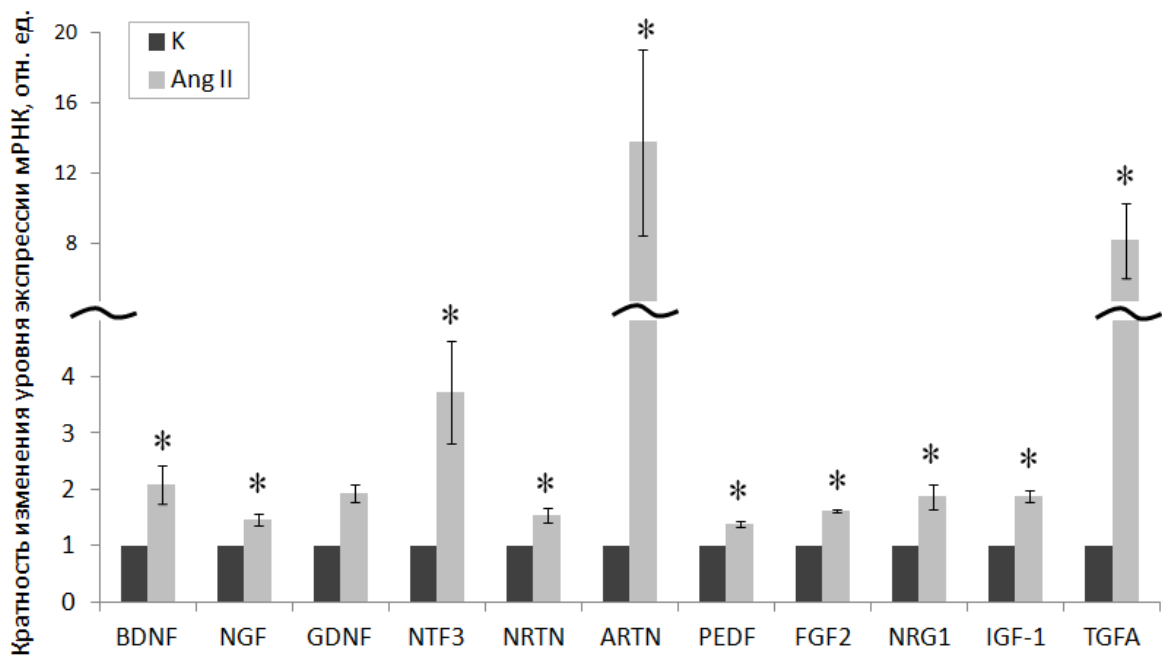


Рисунок 20. Влияние Ang II на экспрессию в МСК мРНК нейротрофических факторов и факторов роста. Содержание мРНК в МСК оценивали с помощью ПЦР «в реальном времени». К – МСК, не обработанные Ang II; Ang II – МСК после обработки Ang II. BDNF - нейротрофический фактор мозга, NGF - фактора роста нервов, GDNF - глиальный нейротрофический фактор, NTF3 - нейротрофин-3, NRTN – нейртулин, ARTN - артемин, PEDF - фактор роста пигментного эпителия, FGF2 - основной фактор роста фибробластов, NRG1 - нейрегулин, IGF-1 - инсулиноподобный фактора роста, TGFA - трансформирующий фактор роста альфа. * - $p < 0,05$ по сравнению с К (ранговый дисперсионный анализа по критерию Краскела-Уоллиса и непараметрическому критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса).

Для того чтобы выяснить, через какой тип рецептора Ang II влияет на способность МСК стимулировать рост нейритов, мы провели ингибиторный анализ с антагонистами AT1- и AT2-рецепторов. МСК предобрабатывали Ang II, лозартаном и PD123319 в течение 1 часа, затем отмывали от гормона и ингибиторов, через 1 сутки кондиционированную среду наносили на Neuro2A. Как и в предыдущих экспериментах, предобработка Ang II значительно усиливала способность МСК стимулировать рост нейритов (рис. 21, столбцы 1 и 2). При этом оказалось, что блокирование AT1-рецептора усиливает эффект Ang II, а

блокирование AT2-рецептора, наоборот, полностью подавляет стимулирующий эффект Ang II (рис. 21, столбцы 3-5). То есть Ang II стимулирует нейротрофические свойства МСК через AT2-рецептор. Это хорошо согласуется с другими данными литературы о преимущественной роли именно AT2-рецептора в регенерации [144; 232; 234].

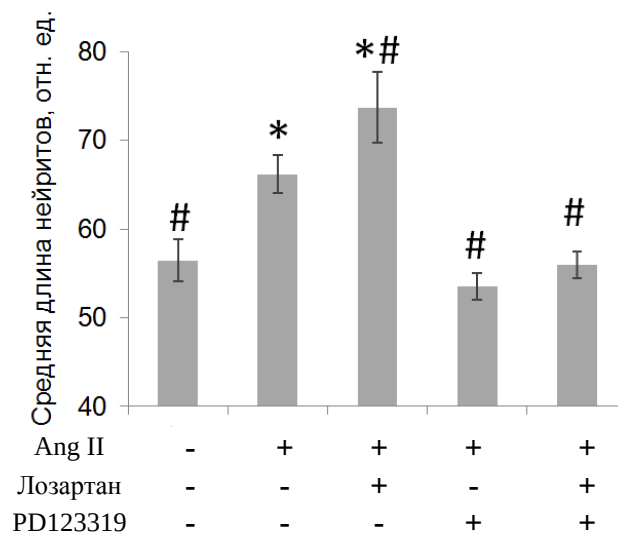


Рисунок 21. Участие ангиотензиновых рецепторов во влиянии Ang II на способность МСК стимулировать рост нейритов у клеток нейробластомы.

Ang II – предобработка МСК Ang II; лозартан – предобработка МСК ингибитором AT1-рецепторов; PD123319 – предобработка МСК ингибитором AT2-рецепторов.

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (первый столбец), # - $p < 0,05$ по сравнению с Ang II (второй столбец), ранговый дисперсионный анализа по критерию Краскела-Уоллиса и непараметрическому критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса).

Таким образом, мы показали, что Ang II влияет на секреторные свойства МСК и стимулирует их нейротрофическую активность. Причем в сравнении с эффектом на ангиогенез через AT1-рецептор, Ang II стимулирует в МСК секрецию нейротрофических факторов через AT2-рецептор. В совокупности с данными об участии Ang II в регуляции адипогенеза, полученные нами результаты подтверждают важную роль Ang II и других компонентов локальной РАС в регуляции регенеративных свойств МСК жировой ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена изучению гормональной регуляции мезенхимных стромальных клеток (МСК) – главных участников метаболизма жировой ткани. Установлено, что МСК жировой ткани экспрессируют все основные компоненты локальной ренин-ангиотензиновой системы (РАС), необходимые для образования и функционирования ангиотензиновых пептидов. Показано, что Ang II влияет на регенеративные свойства МСК: регулирует их дифференцировку в адипоциты и их нейротрофическую активность. При этом показано, что МСК гетерогенны по экспрессии компонентов РАС: выявлена субпопуляция AT2⁺-МСК, обогащенная рецепторами к ангиотензиновым пептидам. Результаты данной работы позволили впервые установить, что несмотря на преобладающую экспрессию в МСК AT1-рецепторов, небольшая субпопуляция AT2⁺-клеток отличается от остальных МСК по функциональным свойствам и обладает повышенным адипогенным потенциалом. Учитывая локальную продукцию Ang II, можно предположить, что именно AT2⁺-субпопуляция стромальных клеток может быть ответственна за развитие гиперплазии жировой ткани при её дисфункциях.

Таким образом, в данной работе установлено, что Ang II играет важную роль в регуляции метаболизма жировой ткани и может избирательно влиять на функционирование отдельных субпопуляций стромальных клеток. Полученные данные позволяют углубить понимание механизмов гормональной регуляции обновления жировой ткани в норме и при ее патологиях.

ВЫВОДЫ

1. МСК жировой ткани содержат функционально-активную локальную ренин-ангиотензиновую систему: экспрессируют мРНК ангиотензиногена, ренина, АПФ, ангиотензиназы С, а также ангиотензиновых рецепторов AT1, AT2, MAS1 и MrgD; большинство МСК несут на своей поверхности АПФ и AT1-рецептор. При этом МСК гетерогенны в отношении способности отвечать на Ang II посредством AT1-рецептора.
2. Выявлена субпопуляция МСК, обогащенная рецепторами к ангиотензиновым пептидам – эти клетки содержат стабильно экспонированный на поверхности AT1-рецептор и соэкспрессируют AT2, MAS1 и MrgD рецепторы.
3. Ang II ингибирует адипогенную дифференцировку МСК ЖТ через AT1-рецептор и активирует через AT2-рецептор. Субпопуляция МСК, обогащенная рецепторами к ангиотензиновым пептидам, имеет повышенный адипогенный потенциал, обусловленный взаимодействием локального Ang II с AT2-рецептором.
4. Ang II, связываясь с AT2-рецептором, повышает способность МСК стимулировать рост нейритов посредством активации экспрессии нейротрофических факторов и факторов роста.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных
Web of Science, Scopus, RSCI:**

1. **Ageeva Liudmila V.**, Sysoeva Veronika Y., Tyurin-Kuzmin Pyotr A., Sharonov George V., Dyikanov Daniyar T., Stambolsky Dmitry V., Kalinina Natalia I. Data supporting that adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells express angiotensin II receptors in situ and in vitro // Data Brief 2017. V. 16. P. 327-333.
2. Sysoeva Veronika Y.¹, **Ageeva Liudmila V.¹**, Tyurin-Kuzmin Pyotr A., Sharonov George V., Dyikanov Daniyar T., Kalinina Natalia I., Tkachuk Vsevolod A. Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor // Stem Cell Research 2017. V. 25, P. 115-122. Импакт-фактор (WoS) – 4.127.
3. Kalinina N., Kharlampieva D., Loguinova M., Butenko I., Pobeguts O., Efimenko A., **Ageeva L.**, Sharonov G., Ischenko D., Alekseev D., Grigorieva O., Sysoeva V., Rubina K., Lazarev V., Govorun V. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes // Stem cell research & therapy 2015. V. 6, P. 221. Импакт-фактор (WoS) – 5.382.

Другие научные работы, опубликованные по теме диссертации:

4. **Агеева Л.В.**, Сысоева В.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Семина Е.В., Калинина Н.И. Ангиотензин II повышает способность мезенхимных стволовых/стромальных клеток стимулировать рост нейритов действуя через рецептор 2 типа // Кардиологический вестник 2017. Т. 15, № 4, стр. 18-22.
5. Georgy Sagaradze, Anastasia Efimenko, **Liudmila Ageeva**, Natalia Kalinina, Natalia Basalova, Pyotr Nimiritskiy, Anna Vnukova, Evgeniy Evtushenko, Olga Makarevich, Vsevolod Tkachuk. Evaluation of the contribution of extracellular vesicles secreted by multipotent mesenchymal stromal cells in MSC-mediated regenerative effects // Journal of Extracellular Vesicles 2017. Sup1, V. 6, p. 43-43.

6. Стамбольский Д.В., Карагяур М.Н., Макаревич П.И., Семина Е.В., **Агеева Л.В.**, Ефименко А.Ю., Акопян Ж.А., Калинина Н.И. Доклинические исследования безопасности и эффективности БМКП на основе мезенхимных стромальных клеток жировой ткани для стимуляции регенерации периферических нервов // Сборник «Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов» 2017. С. 110-132.
7. **L. Ageeva**, P. Tyurin-Kuzmin, V. Sysoeva, N. Kalinina, V. Tkachuk. Angiotensin II stimulates neurogenic potential of adipose derived mesenchymal stromal cells through AGTR2 // Abstracts for Cell Technologies at The Edge: Research & Practice (CTERP) 2016. P. 56.
8. Sysoeva, Veronika Y., **Ageeva, Lyudmila V.**, Fadeeva, Julia I., Tyurin-Kuzmin, Pyotr A., Kalinina, Natalia I, Sharonov, George V., Tkachuk, Vsevolod A. Expression of type 1 angiotensin receptor defines a subpopulation of adipose-derived mesenchymal stromal cells committed to adipose differentiation // ISSCR 2015 poster abstract book 2015. 411 (F-1056).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosen E.D., Spiegelman B.M. What we talk about when we talk about fat // *Cell*. 2014.
2. Schwalie P.C. и др. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots // *Nature*. 2018.
3. Carey R.M. Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system // *Hypertension*. 2013. Т. 62. № 5. С. 818–822.
4. Engeli S., Negrel R., Sharma A.M. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system // *Hypertension*. 2000. Т. 35. № 6. С. 1270–1277.
5. Bernasconi R., Nyström A. Balance and circumstance: The renin angiotensin system in wound healing and fibrosis // *Cell. Signal*. 2018.
6. Janke J. и др. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors // *Diabetes*. 2002. Т. 51. № 6. С. 1699–1707.
7. Considine R. V. Regulation of Leptin Production // *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2001.
8. Zwick R.K. и др. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. // *Cell Metab*. 2018. Т. 27. № 1. С. 68–83.
9. Wang W., Seale P. Control of brown and beige fat development // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2016.
10. J. W. и др. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human // *Cell*. 2012.
11. Villarroya F., Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: The new brown fat activators // *Cell Metab*. 2013.
12. Boström P. и др. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis // *Nature*. 2012.
13. Whittle A.J. и др. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions // *Cell*. 2012.
14. Kim H. и др. Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via αV Integrin Receptors. // *Cell*. 2018. Т. 175. № 7. С. 1756–1768.e17.

15. Seale P. и др. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch // Nature. 2008.
16. Rodeheffer M.S., Birsoy K., Friedman J.M. Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo // Cell. 2008.
17. Wajchenberg B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome // Endocr. Rev. 2000.
18. Rosen E.D., Spiegelman B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis // Nature. 2006.
19. Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism // Int. J. Obes. 2008.
20. Hirsch J., Batchelor B. Adipose tissue cellularity in human obesity // Clin. Endocrinol. Metab. 1976.
21. Krotkiewski M. и др. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution // J. Clin. Invest. 1983.
22. Sadie-Van Gijzen H. Adipocyte biology: It is time to upgrade to a new model. // J. Cell. Physiol. 2019. T. 234. № 3. C. 2399–2425.
23. Kaiden Student A., Hsu R.Y., Lane M.D. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes // J. Biol. Chem. 1980.
24. Smith P.J. и др. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes // J. Biol. Chem. 1988.
25. Pekala P.H., Moss J. 3T3-L1 preadipocyte differentiation and poly(ADP-ribose) synthetase // Mol. Cell. Biochem. 1983.
26. Scott R.E. и др. Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1982.
27. Löffler G., Hauner H. Adipose tissue development: The role of precursor cells and adipogenic factors - Part II: The regulation of the adipogenic conversion by hormones and serum factors // Klin. Wochenschr. 1987.
28. Lehrke M., Lazar M.A. The many faces of PPAR γ // Cell. 2005.
29. Lowell B.B. PPAR γ : An essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function // Cell. 1999.
30. Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor // Cell. 1994.

31. Cao Z., Umek R.M., McKnight S.L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells // *Genes Dev.* 1991.
32. Hamm J.K., Park B.H., Farmer S.R. A Role for C/EBP β in Regulating Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activity during Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes // *J. Biol. Chem.* 2001.
33. Oishi Y. и др. Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation // *Cell Metab.* 2005.
34. Rosen E. и др. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway // *Genes Dev.* 2002.
35. Park B.O., Ahrends R., Teruel M.N. Consecutive Positive Feedback Loops Create a Bistable Switch that Controls Preadipocyte-to-Adipocyte Conversion // *Cell Rep.* 2012.
36. Moon H.S. и др. Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals // *Endocr. Rev.* 2013.
37. Lee M.J. Hormonal regulation of adipogenesis // *Compr. Physiol.* 2017.
38. Wang M. -y. и др. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005.
39. Huan J.N. и др. Adipocyte-selective Reduction of the Leptin Receptors Induced by Antisense RNA Leads to Increased Adiposity, Dyslipidemia, and Insulin Resistance // *J. Biol. Chem.* 2003.
40. Hotta K. и др. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys // *Diabetes.* 2001.
41. Wang Z. V., Scherer P.E. Adiponectin, the past two decades // *J. Mol. Cell Biol.* 2016.
42. Lazra Y. и др. Autocrine/paracrine function of globular adiponectin: Inhibition of lipid metabolism and inflammatory response in 3t3-l1 adipocytes // *J. Cell. Biochem.* 2015.
43. Yan J. и др. Adiponectin-impaired adipocyte differentiation negatively regulates fat deposition in chicken // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 2014.

44. Aubert J. и др. Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells [In Process Citation] // Mol Cell Endocrinol. 2000.
45. Rahman M.S. Prostacyclin: A major prostaglandin in the regulation of adipose tissue development. // J. Cell. Physiol. 2019. T. 234. № 4. С. 3254–3262.
46. Hauner H., Petruschke T., Gries F.A. Endothelin-1 inhibits the adipose differentiation of cultured human adipocyte precursor cells // Metabolism. 1994.
47. Zhang B. и др. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. // Mol. Endocrinol. 1996.
48. Rull A. и др. Insulin resistance, inflammation, and obesity: Role of monocyte chemoattractant protein-1 (orCCL2) in the regulation of metabolism // Mediators Inflamm. 2010.
49. Sartipy P., Loskutoff D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003.
50. Sethi J.K., Hotamisligil G.S. The role of TNF α in adipocyte metabolism // Semin. Cell Dev. Biol. 1999.
51. Prins J.B. и др. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells // Diabetes. 1997.
52. Friedenstein A., Chailakhjan R., Lalykina K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells // Cell Tissue Kinet. 1970. T. 3. № 4. С. 393–403.
53. Friedenstein A.J. и др. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. // Transplantation. 1968. T. 6. № 2. С. 230–247.
54. Pittenger M.F. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells // Science (80-.). 1999. T. 284. № 5411. С. 143–147.
55. Caplan A. Mesenchymal stem cells. // J. Orthop. Res. 1991. T. 9. № 5. С. 641–50.
56. Gronthos S. и др. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. // J. Cell. Physiol. 2001. T. 189. № 1. С. 54–63.
57. Toma J.G. и др. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of

mammalian skin. // Nat. Cell Biol. 2001. T. 3. № 9. C. 778–84.

58. Gargett C.E., Masuda H. Adult stem cells in the endometrium // Mol. Hum. Reprod. 2010. T. 16. № 11. C. 818–834.

59. Gronthos S. и др. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. T. 97. № 25. C. 13625–30.

60. Roufosse C. а и др. Circulating mesenchymal stem cells. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004. T. 36. № 4. C. 585–597.

61. Silva Meirelles L. da, Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. // J. Cell Sci. 2006. T. 119. № Pt 11. C. 2204–13.

62. Pevsner-Fischer M., Levin S., Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. // Stem Cell Rev. 2011. T. 7. № 3. C. 560–8.

63. Phinney D.G. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: Implications for cell therapy // J. Cell. Biochem. 2012. T. 113. № 9. C. 2806–2812.

64. Delorme B. и др. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity // Stem Cells. 2009. T. 27. № 5. C. 1142–1151.

65. Dudakovic A. и др. High-resolution molecular validation of self-renewal and spontaneous differentiation in clinical-grade adipose-tissue derived human mesenchymal stem cells // J. Cell. Biochem. 2014.

66. Caplan A.I. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers // J. Orthop. Res. 2017.

67. Stöckl S. и др. Sox9 modulates proliferation and expression of osteogenic markers of adipose-derived stem cells (ASC) // Cell. Physiol. Biochem. 2013. T. 31. № 4–5. C. 703–717.

68. Creesy C.M. и др. Mesenchymal stem cell osteodifferentiation in response to alternating electric current. // Tissue Eng. Part A. 2013. T. 19. № 3–4. C. 467–74.

69. Markov V. и др. Identification of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem/stromal Cell Populations with Distinct Growth Kinetics, Differentiation Potentials, and Gene Expression Profiles // Stem Cells Dev. 2007. T. 16. № 1. C. 53–74.

70. Dominici M. и др. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. // *Cytotherapy*. 2006. Т. 8. № 4. С. 315–7.
71. Lin G. и др. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. // *Stem Cells Dev.* 2008. Т. 17. № 6. С. 1053–63.
72. Sidney L.E. и др. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors // *Stem Cells*. 2014.
73. Vodyanik M.A. и др. A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells // *Cell Stem Cell*. 2010.
74. Viswanathan C. и др. Significance of CD34 Negative Hematopoietic Stem Cells and CD34 Positive Mesenchymal Stem Cells - A Valuable Dimension to the Current Understanding // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2017. Т. 12. № 6. С. 476–483.
75. Lin C.-S. и др. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? // *Cytotherapy*. 2012. Т. 14. № 10. С. 1159–1163.
76. Lin C.-S. и др. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. // *Histol. Histopathol.* 2013. Т. 28. № 9. С. 1109–16.
77. Crisan M. и др. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs // *Cell Stem Cell*. 2008. Т. 3. № 3. С. 301–313.
78. Caplan A.I. All MSCs Are Pericytes? // *Cell Stem Cell*. 2008. Т. 3. № 3. С. 229–230.
79. Dore-Duffy P. Pericytes: Pluripotent Cells of the Blood Brain Barrier // *Curr. Pharm. Des.* 2008. Т. 14. С. 1581–1593.
80. Keating A. Mesenchymal stromal cells: New directions // *Cell Stem Cell*. 2012.
81. Hoffmann A. и др. Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017.
82. Strioga M. и др. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells // *Stem Cells Dev.* 2012.
83. Xu L. и др. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: A comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow

and adipose tissue // *Stem Cell Res. Ther.* 2017.

84. Mizukami A., Swiech K. Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization // *Stem Cells Int.* 2018.

85. Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine // *Circ. Res.* 2007. T. 100. № 9. C. 1249–1260.

86. Madonna R., Geng Y.-J., Caterina R. De. Adipose Tissue-Derived Stem Cells Characterization and Potential for Cardiovascular Repair // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009. T. 29. № 11. C. 1723–1729.

87. Pittenger M.F., Martin B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics // *Circ. Res.* 2004. T. 95. № 1. C. 9–20.

88. Natesan S. и др. A bilayer construct controls adipose-derived stem cell differentiation into endothelial cells and pericytes without growth factor stimulation. // *Tissue Eng. Part A.* 2011. T. 17. № 7–8. C. 941–953.

89. Kim W.S. и др. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: Activation of dermal fibroblast by secretory factors // *J. Dermatol. Sci.* 2009. T. 53. № 2. C. 96–102.

90. Hofstetter C.P. и др. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. T. 99. № 4. C. 2199–2204.

91. Sasaki M. и др. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. // *J. Neurosci.* 2009. T. 29. № 47. C. 14932–41.

92. Yoon S.H. и др. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. // *Stem Cells.* 2007. T. 25. № 8. C. 2066–73.

93. Nauta A.J., Fibbe W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells // *Blood.* 2007. T. 110. № 10. C. 3499–3506.

94. Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L.E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011. T. 12. № 2. C. 126–31.

95. Nakagami H. и др. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. // *J. Atheroscler. Thromb.* 2006. T. 13. № 2. C. 77–81.

96. Rubina K. и др. Adipose Stromal Cells Stimulate Angiogenesis via Promoting Progenitor Cell Differentiation, Secretion of Angiogenic Factors, and Enhancing Vessel Maturation // *Tissue Eng. Part A*. 2009. Т. 15. № 8. С. 2039–2050.
97. Carlson K.B. и др. Mesenchymal stem cells facilitate axon sorting, myelination, and functional recovery in paralyzed mice deficient in Schwann cell-derived laminin // *Glia*. 2011. Т. 59. № 2. С. 267–277.
98. Lopatina T. и др. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth De Novo // *PLoS One*. 2011. Т. 6. № 3.
99. Kalinina N.I. и др. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3. № 4. С. 30–7.
100. Hung S.-C. и др. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis // *Stem Cells*. 2007. Т. 25. № 9. С. 2363–2370.
101. Kinnaird T. и др. Bone marrow-derived cells for enhancing collateral development: Mechanisms, animal data, and initial clinical experiences // *Circ. Res*. 2004. Т. 95. № 4. С. 354–363.
102. Cai L. и др. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. // *Stem Cells*. 2009. Т. 27. № 1. С. 230–237.
103. Wang J. и др. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo // *Brain Res*. 2009. Т. 1262. С. 7–15.
104. Glavaski-Joksimovic A., Bohn M.C. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease // *Exp. Neurol*. 2013. Т. 247. С. 25–38.
105. Tanna T., Sachan V. Mesenchymal Stem Cells: Potential in Treatment of Neurodegenerative Diseases // *Curr. Stem Cell Res. Ther*. 2014.
106. Millán-Rivero J.E. и др. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect axotomized rat retinal ganglion cells via secretion of anti-inflammatory and

neurotrophic factors // Sci. Rep. 2018.

107. Drago D. и др. The stem cell secretome and its role in brain repair // Biochimie. 2013.

108. Mukai T., Tojo A., Nagamura-Inoue T. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells contribute to neuroprotection in neonatal cortical neurons damaged by oxygen-glucose deprivation // Front. Neurol. 2018.

109. Kumar A. и др. Secreted trophic factors of Human umbilical cord stromal cells induce differentiation and neurite extension through PI3K and independent of cAMP pathway // Ann. Neurosci. 2015.

110. Junyi L., Na L., Yan J. Mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor and promote retinal ganglion cell survival after traumatic optic neuropathy // J. Craniofac. Surg. 2015.

111. Hofer H.R., Tuan R.S. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies // Stem Cell Res. Ther. 2016.

112. Meirelles Lda S., Nardi N.B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells // Front Biosci. 2009. T. 14. C. 4281–4298.

113. Konala V.B.R. и др. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration // Cytotherapy. 2016. T. 18. № 1. C. 13–24.

114. Xing L. и др. Mesenchymal stem cells, not conditioned medium, contribute to kidney repair after ischemia-reperfusion injury. // Stem Cell Res. Ther. 2014. T. 5. № 4. C. 101.

115. Naji A. и др. Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death // Stem Cell Res. Ther. 2019. T. 10. № 1. C. 56.

116. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. // Nat. Rev. Immunol. 2008. T. 8. № 9. C. 726–736.

117. Rubtsov Y. и др. Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1 // Stem Cells Int. 2017.

118. Andreeva E. и др. Interaction of multipotent mesenchymal stromal and immune

cells: Bidirectional effects // Cytotherapy. 2017.

119. Lopatina T. и др. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. // Cell Commun. Signal. 2014. T. 12. № 1. С. 26.

120. Wang Y. и др. Differentially expressed microRNAs in bone marrow mesenchymal stem cell-derived microvesicles in young and older rats and their effect on tumor growth factor-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition in HK2 cells. // Stem Cell Res. Ther. 2015. T. 6. С. 185.

121. Wu P. и др. MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration // Cytotherapy. 2018.

122. Xue C. и др. Exosomes derived from hypoxia-treated human adipose mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through the PKA signaling pathway // Stem Cells Dev. 2018.

123. Farinazzo A. и др. Murine adipose-derived mesenchymal stromal cell vesicles: in vitro clues for neuroprotective and neuroregenerative approaches. // Cytotherapy. 2015. T. 17. № 5. С. 571–8.

124. Mead B., Tomarev S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes promote survival of retinal ganglion cells through mirna-dependent mechanisms // Stem Cells Transl. Med. 2017.

125. Scarfi S. Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions // World J. Stem Cells. 2014.

126. Roszek K., Wujak M. How to influence the mesenchymal stem cells fate? Emerging role of ectoenzymes metabolizing nucleotides // J. Cell. Physiol. 2018.

127. Jiang L.H. и др. ATP-induced Ca²⁺-signalling mechanisms in the regulation of mesenchymal stem cell migration // Cell. Mol. Life Sci. 2017.

128. Tyurin-Kuzmin P.A. и др. Nox4 and duox1/2 mediate redox activation of mesenchymal cell migration by PDGF // PLoS One. 2016.

129. Matsuda S. и др. Reactive Oxygen Species, Superoxide Dimutases, and PTEN-p53-AKT-MDM2 Signaling Loop Network in Mesenchymal Stem/Stromal Cells Regulation // Cells. 2018.

130. Martin E.C. и др. MicroRNA regulation of stem cell differentiation and diseases of the bone and adipose tissue: Perspectives on miRNA biogenesis and cellular transcriptome // Biochimie. 2016.
131. Kalinina N. и др. MiR-92a regulates angiogenic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells // Exp. Cell Res. 2015.
132. Efimenko A. и др. Data supporting that miR-92a suppresses angiogenic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells by down-regulating hepatocyte growth factor // Data Br. 2016.
133. Clark E.A. и др. Concise review: MicroRNA function in multipotent mesenchymal stromal cells // Stem Cells. 2014.
134. Steward A.J., Kelly D.J. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation // J. Anat. 2015.
135. Kalinina N. и др. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes // Stem Cell Res Ther. 2015. T. 6. C. 221.
136. Kusuma G.D. и др. Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect // Stem Cells Dev. 2017.
137. Dokić J.M., Tomić S.Z., Čolić M.J. Cross-Talk Between Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Dendritic Cells. // Curr. Stem Cell Res. Ther. 2015.
138. Zubkova E.S. и др. Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha // J. Cell. Biochem. 2016.
139. Li A. и др. PDGF-AA promotes osteogenic differentiation and migration of mesenchymal stem cell by down-Regulating PDGFRa and derepressing BMP-Smad1/5/8 signaling // PLoS One. 2014.
140. Campbell D.J. Circulating and tissue angiotensin systems // J Clin Invest. 1987. T. 79. № 1. C. 1–6.
141. Laragh J.H. Renin-angiotensin-aldosterone system for blood pressure and electrolyte homeostasis and its involvement in hypertension, in congestive heart failure and in associated cardiovascular damage (myocardial infarction and stroke). // J. Hum. Hypertens. 1995. T. 9. № 6. C. 385–390.

142. Dinh D.T. и др. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function // Clin Sci. 2001. T. 100. № 5. С. 481–492.
143. Durik M., Seva Pessoa B., Roks A.J. The renin-angiotensin system, bone marrow and progenitor cells // Clin Sci. 2012. T. 123. № 4. С. 205–223.
144. Namsolleck P. и др. AT₂-receptor stimulation enhances axonal plasticity after spinal cord injury by upregulating BDNF expression // Neurobiol Dis. 2013. T. 51. С. 177–191.
145. Stoll M. и др. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. // J. Clin. Invest. 1995. T. 95. № 2. С. 651–657.
146. Emanuelli C. и др. Angiotensin AT(1) receptor signalling modulates reparative angiogenesis induced by limb ischaemia. // Br. J. Pharmacol. 2002. T. 135. № 1. С. 87–92.
147. Khakoo A.Y. и др. Does the renin-angiotensin system participate in regulation of human vasculogenesis and angiogenesis? // Cancer Res. 2008. T. 68. № 22. С. 9112–5.
148. Balakumar P., Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT₁ receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology // Cell. Signal. 2014.
149. Wu C.-H. и др. Renin-Angiotensin System and Cardiovascular Functions. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2018. T. 38. № 7. С. e108–e116.
150. Guo D.F. и др. The genomic organization of human angiotensin II Type 1 receptor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994.
151. Sasamura H. и др. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992.
152. Kaschina E., Unger T. Angiotensin AT₁/AT₂ receptors: Regulation, signalling and function // Blood Press. 2003.
153. Lenkei Z. и др. Expression of angiotensin type-1 (AT₁) and type-2 (AT₂) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. // Front. Neuroendocrinol. 1997. T. 18. № 18. С. 383–439.

154. Song K. и др. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. // J. Comp. Neurol. 1992. T. 316. № 4. С. 467–84.
155. Schubert B. и др. Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms // Clin. Endocrinol. (Oxf). 2001.
156. Suzuki H. и др. Endothelial nitric oxide synthase inhibits G12/13 and rho-kinase activated by the angiotensin II type-1 receptor: implication in vascular migration. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009. T. 29. № 2. С. 217–24.
157. Lavenus S. и др. Label-free cell signaling pathway deconvolution of angiotensin type 1 receptor reveals time-resolved G-protein activity and distinct AngII and AngIIIIV responses. // Pharmacol. Res. 2018. T. 136. С. 108–120.
158. Ushio-Fukai M. и др. Angiotensin II Receptor Coupling to Phospholipase D Is Mediated by the $\beta\gamma$ Subunits of Heterotrimeric G Proteins in Vascular Smooth Muscle Cells // Mol. Pharmacol. 1999. T. 55. № 1. С. 142–149.
159. Freeman E.J., Ruehr M.L., Dorman R. V. ANG II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. // Am. J. Physiol. 1998. T. 274. № 1 Pt 1. С. C282-8.
160. Dulin N.O. и др. Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998. T. 95. № 14. С. 8098–102.
161. Griendling K.K. и др. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. // Circ. Res. 1994. T. 74. № 6. С. 1141–8.
162. Thomas W.G., Thekkumkara T.J., Baker K.M. Molecular mechanisms of angiotensin II (AT1a) receptor endocytosis // Clin Exp Pharmacol Physiol. 1996. T. 23 Suppl 3. С. S74-80.
163. Hallberg M., Sävmarker J., Hallberg A. Angiotensin Peptides as AT2 Receptor Agonists. // Curr. Protein Pept. Sci. 2017. T. 18. № 8. С. 809–818.
164. Chow B.S.M., Allen T.J. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease. // Clin. Sci. (Lond). 2016. T. 130. № 15. С. 1307–26.
165. MacGregor D.P. и др. Angiotensin II receptor subtypes in the human central

nervous system. // Brain Res. 1995. T. 675. № 1–2. C. 231–40.

166. Tsutsumi Y. и др. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. // Circ. Res. 1998. T. 83. № 10. C. 1035–46.

167. Porrello E.R. и др. Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles // Cell. Signal. 2011. T. 23. № 11. C. 1767–1776.

168. Miura S.I., Karrik S.S., Saku K. Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation // J. Biol. Chem. 2005. T. 280. № 18. C. 18237–18244.

169. AbdAlla S. и др. The angiotensin II AT₂ receptor is an AT₁ receptor antagonist. // J. Biol. Chem. 2001. T. 276. № 43. C. 39721–39726.

170. Yang J. и др. Angiotensin II AT₂ receptor decreases AT₁ receptor expression and function via nitric oxide/cGMP/Sp1 in renal proximal tubule cells from Wistar-Kyoto rats // J Hypertens. 2012. T. 30. № 6. C. 1176–1184.

171. Villela D. и др. Angiotensin type 2 receptor (AT₂R) and receptor Mas: a complex liaison // Clin. Sci. 2015. T. 128. C. 227–234.

172. Lehtonen J.Y. и др. Analysis of functional domains of angiotensin II type 2 receptor involved in apoptosis. // Mol. Endocrinol. 1999. T. 13. № 7. C. 1051–60.

173. Wang N. и др. Promyelocytic leukemia zinc finger protein activates GATA4 transcription and mediates cardiac hypertrophic signaling from angiotensin II receptor 2 // PLoS One. 2012.

174. Sandmann S. и др. Differential effects of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors on the expression, translation and function of the Na⁺-H⁺ exchanger and Na⁺-HCO₃⁻ symporter in the rat heart after myocardial infarction. // J. Am. Coll. Cardiol. 2001. T. 37. № 8. C. 2154–65.

175. Taugner R. и др. The intrarenal renin-angiotensin-system. An immunocytochemical study on the localization of renin, angiotensinogen, converting enzyme and the angiotensins in the kidney of mouse and rat. // Klin. Wochenschr. 1982. T. 60. № 19. C. 1218–22.

176. Schunkert H., Ingelfinger J.R., Dzau V.J. Evolving concepts of the intrarenal

- renin-angiotensin system in health and disease: contributions of molecular biology. // *Ren. Physiol. Biochem.* T. 14. № 4–5. C. 146–54.
177. Pieruzzi F., Abassi Z.A., Keiser H.R. Expression of renin-angiotensin system components in the heart, kidneys, and lungs of rats with experimental heart failure. // *Circulation.* 1995. T. 92. № 10. C. 3105–12.
178. Falkenhahn M. и др. The renin-angiotensin system in the heart and vascular wall: new therapeutic aspects. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1994. T. 24 Suppl 2. C. S6-13.
179. Dzau V.J. Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. // *Basic Res. Cardiol.* 1993. T. 88 Suppl 1. C. 1–14.
180. Gohlke P. и др. [The renin-angiotensin system: systemic and local function]. // *Z. Kardiol.* 1988. T. 77 Suppl 3. C. 1–12.
181. Cassis L.A. Fat cell metabolism: insulin, fatty acids, and renin. // *Curr. Hypertens. Rep.* 2000. T. 2. № 2. C. 132–8.
182. Schling P., Loffler G. Effects of angiotensin II on adipose conversion and expression of genes of the renin-angiotensin system in human preadipocytes // *Horm Metab Res.* 2001. T. 33. № 4. C. 189–195.
183. Schling P. и др. Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1999. T. 23. № 4. C. 336–41.
184. Leung P.S. Local RAS. : Springer, Dordrecht, 2010. C. 69–87.
185. Paul M., Poyan Mehr A., Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems // *Physiol. Rev.* 2006. T. 86. № 3. C. 747–803.
186. Lee M.A. и др. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. // *Circulation.* 1993. T. 87. № 5 Suppl. C. IV7-13.
187. Zhuo J.L. и др. New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2013. T. 4. C. 166.
188. Nakagawa P., Sigmund C.D. How Is the Brain Renin–Angiotensin System Regulated? // *Hypertension.* 2017. T. 70. № 1. C. 10–18.
189. Pahlavani M. и др. Regulation and Functions of the Renin-Angiotensin System in

White and Brown Adipose Tissue // *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. C. 1137–1150.

190. Maier C. и др. Prolylcarboxypeptidase deficiency is associated with increased blood pressure, glomerular lesions, and cardiac dysfunction independent of altered circulating and cardiac angiotensin II // *J. Mol. Med.* 2017. Т. 95. № 5. С. 473–486.

191. Etelvino G.M., Peluso A.A.B., Santos R.A.S. New components of the renin-angiotensin system: Alamandine and the Mas-related G protein-coupled receptor D // *Curr. Hypertens. Rep.* 2014. Т. 16. № 6.

192. Nehme A. и др. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2019. Т. 6. № 2. С. 14.

193. Lu H. и др. Angiotensin II increases adipose angiotensinogen expression. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. Т. 292. № 5. С. E1280-7.

194. Engeli S., Sharma A.M. Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease // *Horm Metab Res.* 2000. Т. 32. № 11–12. С. 485–499.

195. Goossens G.H. и др. Angiotensin II: a major regulator of subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. // *J. Physiol.* 2006. Т. 571. № Pt 2. С. 451–60.

196. Engeli S. и др. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. // *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*. 2005. Т. 45. № 3. С. 356–62.

197. Tsuchiya K. и др. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression via a nuclear factor- κ B-dependent pathway in rat preadipocytes // *Am. J. Physiol. Metab.* 2006. Т. 291. № 4. С. E771–E778.

198. Cassis L.A. и др. Local adipose tissue renin-angiotensin system // *Curr. Hypertens. Rep.* 2008. Т. 10. № 2. С. 93–98.

199. Jones B.H., Standridge M.K., Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells // *Endocrinology*. 1997. Т. 138. № 4. С. 1512–1519.

200. Brucher R. и др. Larger anti-adipogenic effect of angiotensin II on omental preadipose cells of obese humans // *Obes. (Silver Spring)*. 2007. Т. 15. № 7. С. 1643–1646.

201. Matsushita K. и др. Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes // *Hypertension*. 2006. Т. 48. № 6.

C. 1095–1102.

202. Sharma A.M. и др. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells // *Hypertension*. 2002. Т. 40. № 5. С. 609–611.

203. Sarzani R. и др. Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. // *Int. J. Obes. (Lond)*. 2008. Т. 32. № 2. С. 259–67.

204. Frantz E.D.C. и др. Modulation of the renin-angiotensin system in white adipose tissue and skeletal muscle: focus on exercise training. // *Clin. Sci. (Lond)*. 2018. Т. 132. № 14. С. 1487–1507.

205. Strawn W.B. и др. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells // *Br J Haematol*. 2004. Т. 126. № 1. С. 120–126.

206. Richmond R.S. и др. Angiotensin II stimulates arachidonic acid release from bone marrow stromal cells. // *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* 2004. Т. 5. № 4. С. 176–82.

207. Kim Y.M. и др. Angiotensin II-induced differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008. Т. 40. № 11. С. 2482–91.

208. Numasawa Y. и др. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. // *Stem Cells*. 2011. Т. 29. № 9. С. 1405–14.

209. Ikhapoh I.A., Pelham C.J., Agrawal D.K. Synergistic effect of angiotensin II on vascular endothelial growth factor-A-mediated differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells. // *Stem Cell Res. Ther.* 2015. Т. 6. № 1. С. 4.

210. Cheng C.-I. и др. Valsartan impairs angiogenesis of mesenchymal stem cells through Akt pathway. // *Int. J. Cardiol.* 2013. Т. 167. № 6. С. 2765–74.

211. Liu C. и др. Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin II enhances paracrine effects, angiogenesis, gap junction formation and therapeutic efficacy for myocardial infarction // *Int J Cardiol.* 2015. Т. 188. С. 22–32.

212. Shi R.Z. и др. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis

in mesenchymal stem cells // *Exp Cell Res.* 2009. T. 315. № 1. C. 10–15.

213. Fan Y. и др. Local renin-angiotensin system regulates hypoxia-induced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. T. 8. № 3. C. 2505–2514.

214. Liu C. и др. Activation of the AT1R/HIF-1 α /ACE axis mediates angiotensin II-induced VEGF synthesis in mesenchymal stem cells // *Biomed Res Int.* 2014. T. 2014. C. 627380.

215. McCarthy C.A. и др. Angiotensin II type 2 receptor stimulation initiated after stroke causes neuroprotection in conscious rats // *Hypertension.* 2012. T. 60. № 6. C. 1531–1537.

216. Mogi M., Iwai M., Horiuchi M. Emerging concepts of regulation of angiotensin II receptors: New players and targets for traditional receptors // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. T. 27. № 12. C. 2532–2539.

217. Labandeira-Garcia J.L. и др. Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration // *Front. Aging Neurosci.* 2017. T. 9.

218. Namsolleck P. и др. AT2 Receptor and Tissue Injury: Therapeutic Implications // *Curr. Hypertens. Rep.* 2014. T. 16. № 2. C. 416.

219. Villapol S., Saavedra J.M. Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers // *Am. J. Hypertens.* 2015.

220. Bennion D.M., Steckelings U.M., Sumners C. Neuroprotection via AT2 receptor agonists in ischemic stroke // *Clin. Sci.* 2018. T. 132. № 10. C. 1055–1067.

221. Schling P. Expression of angiotensin II receptors type 1 and type 2 in human preadipose cells during differentiation // *Horm Metab Res.* 2002. T. 34. № 11–12. C. 709–715.

222. Chen J.G., Spagnoli A., Torquati A. Adipogenic differentiation of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells: effect of gastric bypass surgery // *Surg Endosc.* 2012. T. 26. № 12. C. 3449–3456.

223. Kim Y.M. и др. Angiotensin II-induced differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008.

T. 40. № 11. C. 2482–91.

224. Cain M.D., Coghlan J.P., Catt K.J. Measurement of angiotensin II in blood by radioimmunoassay // Clin. Chim. Acta. 1972. T. 39. № 1. C. 21–34.

225. Gordon Walker W. и др. Arterial and Venous Angiotensin II in Normal Subjects Relation to Plasma Renin Activity and Plasma Aldosterone Concentration, and Response to Posture and Volume Changes.

226. Düsterdieck G., McElwee G. Estimation of Angiotensin II Concentration in Human Plasma by Radioimmunoassay. Some Applications to Physiological and Clinical States // Eur. J. Clin. Invest. 1971. T. 2. № 1. C. 32–38.

227. Vinson G.P., Ho M.M., Puddefoot J.R. The distribution of angiotensin II type 1 receptors, and the tissue renin-angiotensin systems // Mol. Med. Today. 1995.

228. Saye J., Lynch K.R., Peach M.J. Changes in angiotensinogen messenger RNA in differentiating 3T3-F442A adipocytes. // Hypertens. (Dallas, Tex. 1979). 1990. T. 15. № 6 Pt 2. C. 867–71.

229. Safonova I. и др. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. // Biochem. J. 1997. T. 322 (Pt 1). № 1. C. 235–9.

230. Hu, E., Liang, P., and Spiegelman B.M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity // J. Biol. Chem. 1996.

231. Rehman J. и др. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells // Circulation. 2004.

232. Chao J. и др. Angiotensin II increased neuronal stem cell proliferation: role of AT2R // PLoS One. 2013. T. 8. № 5. C. e63488.

233. Koyama Y. и др. Short-term Heat Exposure Promotes Hippocampal Neurogenesis via Activation of Angiotensin II Type 1 Receptor in Adult Rats // Neuroscience. 2018.

234. Mogi M., Horiuchi M. Effect of angiotensin II type 2 receptor on stroke, cognitive impairment and neurodegenerative diseases // Geriatr Gerontol Int. 2013. T. 13. № 1. C. 13–18.

БЛАГОДАРНОСТИ

Прежде всего, я выражаю огромную благодарность моему научному руководителю Наталье Игоревне Калининой за профессионализм, ценные советы, за всестороннюю поддержку и терпение на протяжении всего времени выполнения настоящей работы. Я очень благодарна Веронике Юрьевне Сысоевой и Петру Алексеевичу Тюрину-Кузьмину за руководство, большой вклад в обсуждение идей и результатов, за интересную командную работу и помощь в освоении новых методов. Я выражаю глубокую признательность заведующему кафедрой биохимии и молекулярной медицины Всеволоду Арсеньевичу Ткачуку за руководство, ценные идеи и передачу важного опыта ведения исследовательской работы, за возможность обучаться в аспирантуре, развивать актуальное направление регенеративной медицины и работать в интересном коллективе опытных специалистов. Также я хочу поблагодарить весь коллектив кафедры биохимии и молекулярной медицины за приятную рабочую атмосферу, готовность помогать и делиться опытом и за обсуждение важных научных проблем на лабораторных семинарах. Отдельно выражаю огромную благодарность Георгию Шаронову и Данияру Дыйканову за проведение сортировки клеток и помощь в освоении методов проточной цитофлуориметрии, Екатерине Сёминой и Максиму Карагяуру за помощь в освоении метода определения нейротрофической активности МСК, Александру Егорову за ценные советы по адипогенной дифференцировке, Александру Балацкому за полезные знания по использованию различных методов ПЦР. Также я хочу поблагодарить коллег из лаборатории протеомного анализа ФНКЦ физико-химической медицины за изучение секретома МСК методами жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. Кроме того, я хочу поблагодарить заведующего лабораторией сосудистой биологии и атеросклероза (Baker Heart and Diabetes Institute, Австралия) Алекса Бобика за обсуждение результатов исследования и ценные рекомендации. Спасибо всем моим коллегам и близким, которые поддерживали меня и помогали двигаться вперед.