



Российский
научный
фонд



МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА



ОБЩЕСТВО
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ
МЕДИЦИНЫ



ШКОЛА МОЛОДОГО УЧЕНОГО РНФ

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ:
РЕГУЛЯЦИЯ ОБНОВЛЕНИЯ
И РЕПАРАЦИИ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА



Обращение руководителя проекта



Академик
Тщук Всеволод Арсеньевич,
Директор Института
регенеративной медицины,
зав. кафедрой биохимии
и регенеративной медицины,
Декан Факультета
фундаментальной медицины МГУ
имени М.В. Ломоносова

Глубокоуважаемые коллеги!

24 ноября 2022 года в программе V Национального конгресса по регенеративной медицине состоялась очередная Школа молодого ученого РНФ в рамках гранта РНФ 19-75-30007 «Фундаментальные в проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека». Проведение Школы позволило обсудить самые актуальные направления регенеративной биомедицины, в том числе, и приоритетные результаты, полученные при выполнении гранта. На основании результатов проекта созданы научные предпосылки для выбора мишеней при создании новых методов регенеративной медицины, в том числе и направленных на стимуляцию эндогенной регенерации тканей человека.

Программа Школы включала два симпозиума, посвященных поиску новых мишеней для регенеративной медицины, а также обсуждению механизмов метаболической, нейроэндокринной и эпигенетической регуляции дифференцировки стволовых клеток.

В работе Школы приняли участие ведущие ученые в области регенеративной медицины, а сопредседателями выступили молодые ученые - основные исполнители проекта.

Мы благодарим всех за участие в работе Школы и будем рады видеть вас на будущих мероприятиях, посвященных регенеративной медицине.

Обращение индустриального партнера проекта



Игнатьев Василий Геннадьевич,
Генеральный директор АО «Р-Фарм»

Глубокоуважаемые коллеги!

Создание научных основ для формирования новых подходов, позволяющих стимулировать регенерацию тканей, – одна из приоритетных задач современной биомедицины. Для успешного развития данного направления группа компаний «Р-Фарм» софинансировала исследования, выполняемые в рамках гранта РФФИ 19-75-30007 «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека». Результаты проекта о новых механизмах регуляции активности стволовых клеток и способах предотвращения фиброза тканей могут лечь в основу перспективных прикладных разработок. «Р-Фарм» заинтересован и в продолжении исследований, и в прикладных разработках на основе полученных данных.

Симпозиум 1 Новые мишени для регенеративной медицины

Симпозиум посвящен нейрогуморальной регуляции обновления и регенерации тканей, а также поиску новых мишеней для стимуляции восстановления тканей и предотвращения развития фиброза, включая транскрипционные факторы, компоненты секретома и регуляторные микроРНК.

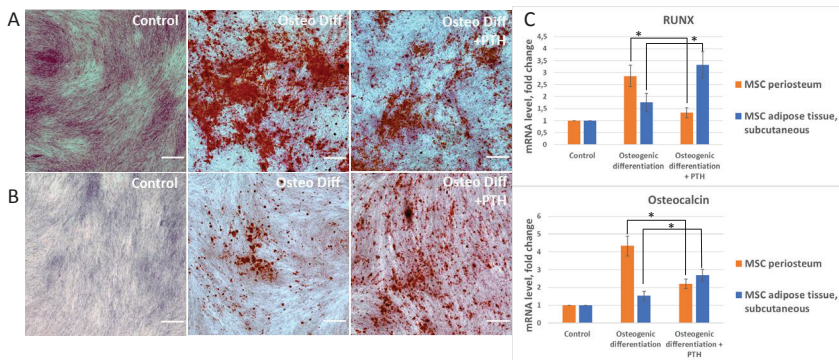
Доклады:

- «Потенциальные терапевтические мишени при нарушениях метаболизма костной ткани»
Воронцова Мария Владимировна
- «Поиск транскрипционных факторов, регулирующих транскриптом скелетной мышцы человека при резком снижении двигательной активности»
Попов Даниил Викторович
- «Разработка препарата для лечения геморрагического инсульта на базе секретома мезенхимных стволовых клеток»
Карагяур Максим Николаевич
- «МикроРНК-29с и микроРНК-129 в составе внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток способствуют разрешению фиброза легких через управление дифференцировкой миофибробластов и их предшественников»
Басалова Наталья Андреевна
- «Самоорганизация путем мезенхимальной конденсации в клеточных пластах определяет дифференцировочную судьбу МСК»
Нимирицкий Петр Петрович



Воронцова Мария Владимировна

Переключение сигнального паттерна ответа приводит к диаметрально противоположным эффектам ПТГ на остеогенную дифференцировку МСК



Потенциальные терапевтические мишени при нарушениях метаболизма костной ткани

ПТГ – основной гормональный регулятор гомеостаза кости. Нарушения секреции ПТГ сопряжено с нетипичными проявлениями не только в кости, но и в жировой ткани в виде очагов эктопической оссификации. Биологические механизмы, лежащие в основе разнонаправленного действия ПТГ на костную ткань или на жировую ткань недостаточно ясны. **Цель работы** – определить молекулярные механизмы влияния ПТГ на процессы дифференцировки МСК в остеогенном направлении.

МСК выделены из подкожной жировой ткани области живота (ЖТОЖ) и ткани надкостницы 16-и здоровых доноров. Активация рцПТГ оценивалась при помощи съёмки кальциевой сигнализации. Для оценки вклада разных сигнальных путей в процесс дифференцировки проводилась индукция остеогенеза в культуре МСК как в присутствии, так и в отсутствии ПТГ с использованием селективных ингибиторов Фосфолипазы С и Аденилатциклазы. Для оценки эффективности остеогенной дифференцировки проводили окрашивание культуры клеток при помощи набора Osteogenesis Quantitation Kit (Millipore). Полученные препараты анализировали при помощи микроскопа Leica AF6000 снабженного камерой DFC 420C

ПТГ разнонаправленно влияет на остеогенную дифференцировку МСК, выделенных из различных организменных депо: 1) выраженное проостеогенное действие, а именно увеличению отложений кальция и экспрессии генов-маркеров остеогенеза в ЖТОЖ; 2) снижение дифференцировки в МСК надкостницы. Сравнение уровня экспрессии генов-маркеров показало, что ПТГ усиливает дифференцировку МСК ЖТОЖ до значений, превышающих таковые в МСК надкостницы. МСК разных организменных депо, демонстрируют различный профиль Ca^{2+} сигналов в ответ на ПТГ: 1) одиночное транзитное повышение внутриклеточного Ca^{2+} , амплитуда которого не зависит от действующей концентрации гормона; 2) кальциевые осцилляции двух вариантами: 2а) появляются после действия ПТГ; 2б) осцилляции имеются в отсутствие гормона, действие ПТГ увеличивает их частоту; 3) плавное повышение внутриклеточного Ca^{2+} . Доля клеток, отвечающих каждым из вариантов, существенно различается в исследованных локациях. Селективный ингибитор аденилатциклазы блокирует проостеогенное действие ПТГ на МСК, а добавление ингибитора фосфолипазы С не оказывает влияния на стимулирующий эффект ПТГ. Кроме того, с помощью ингибиторного анализа было показано, что часть клеток отвечает на ПТГ осцилляциями путем активации цАМФ-зависимого пути, а не классического форсфоинозитидного пути.

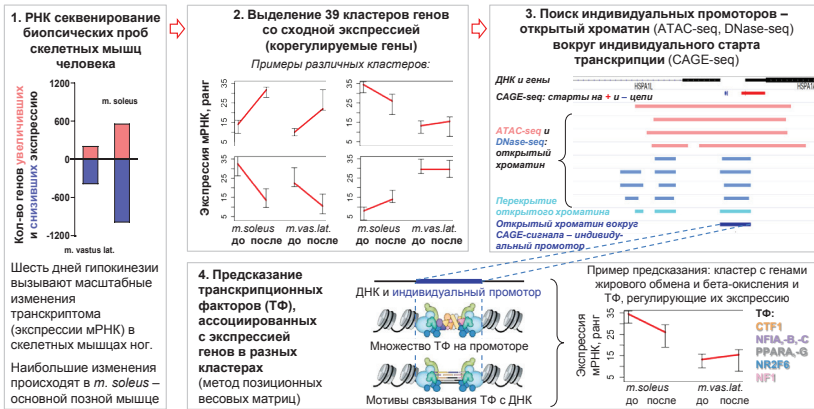
Далее, согласно нашим данным, ключевую роль в передаче проостеогенного сигнала от рецептора ПТГ в МСК играет аденилатциклазная система. При этом в клетках млекопитающих экспрессируется 10 изоформ данного фермента, отличающихся по своей регуляции. Для того чтобы установить вклад конкретных изоформ в реализацию эффекта ПТГ на МСК мы проанализировали изменение экспрессии различных изоформ аденилатциклазы при дифференцировке клеток в различных направлениях. Для изоформ интереса мы приступили к созданию клеточных линий с селективным нокаутом этих изоформ аденилатциклазы.

Выводы: Разница в кальциевом ответе **может лежать в основе разнонаправленной дифференцировки в МСК в ответ на ПТГ.** Остеогенный эффект ПТГ на МСК жировой ткани реализуется предположительно реализуется именно через активацию сигнальной оси Gs/аденилатциклаза/протеинкиназа А



Попов Даниил Викторович,
к.б.н., в.н.с., зав.лаб. физиологии
мышечной деятельности
Институт медико-биологических
проблем РАН

Поиск транскрипционных факторов, регулирующих транскриптом скелетной мышцы человека при резком снижении двигательной активности
Попов Д.В. (ГНЦ РФ ИМБП РАН, Москва)



Поиск транскрипционных факторов, регулирующих транскриптом скелетной мышцы человека при резком снижении двигательной активности

Резкое снижение двигательной активности (постельный режим, микрогравитация в космосе и т.п.) оказывает негативное влияние на функции скелетных мышц и на организм в целом. Так, уже через неделю гипокинезии происходит снижение мышечной массы (~0,4%/день) и силы, митохондриальной плотности, активности окислительных ферментов и работоспособности, а также инсулиновой чувствительности мышц и организма. Эти изменения связаны с подавлением трансляции, увеличением деградации мышечных белков и с масштабными изменениями в генной экспрессии. Изменение транскриптомного профиля скелетных мышц, вызванное гипокинезией, достаточно хорошо охарактеризовано [1, 2], однако регуляторные механизмы, ответственные за эти изменения (в частности, транскрипционные факторы и ассоциированные с ними сигнальные пути), изучены явно недостаточно.

В докладе обсуждается влияние резкого снижения двигательной активности (6 суток нахождения в «сухой» иммерсии) на изменения транскриптомного профиля (RNA-seq) *m. soleus* – основной постуральной мышцы, состоящей преимущественно из медленных мышечных волокон, и смешанной *m. vastus lateralis*. В базальном состоянии генная экспрессия значительно различается между этими мышцами (~1500 мРНК). Нахождение в иммерсии вызывает значительно более выраженные изменения транскриптома в *m. soleus* (562 мРНК увеличили и 996 мРНК снизили экспрессию), чем в *m. vastus lateralis* (209 мРНК увеличили и 392 мРНК снизили экспрессию).

Среди генов, изменивших экспрессию, были выделены кластеры со сходным экспрессионным профилем – предположительно, корегулируемые гены. Поиск транскрипционных факторов, ассоциированных с изменением экспрессии, проводили для каждого кластера методом позиционных весовых матриц. Для этого искали мотивы связывания транскрипционных факторов в индивидуальном для каждого гена промоторном регионе – открытый хроматин вокруг старта инициации транскрипции, определённый в нашем предыдущем исследовании [3] по данным ATAC-seq, DNase-seq и ChIP-seq.

Предложенный нами подход позволил выявить группы коэкспрессируемых генов и несколько десятков транскрипционных факторов, ассоциированных с разнонаправленными изменениями генной экспрессии в них. Часть из этих транскрипционных факторов выделены как потенциальные мишени для предотвращения негативного влияния гипокинезии на функции скелетных мышц. Значимость этих факторов для развития указанных негативных эффектов требует дальнейшей проверки в модельных исследованиях с подавлением/увеличением генной экспрессии на клетках и/или животных.

При поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-298 от 18.04.2022 г.



Карагяур Максим Николаевич,
к.б.н., в.н.с. факультета
фундаментальной медицины МГУ
имени М.В. Ломоносова

Разработка препарата для лечения геморрагического инсульта на базе секрета мезенхимных стромальных клеток

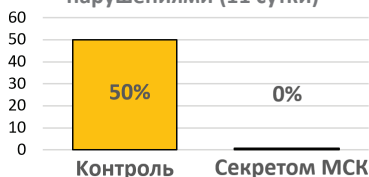
Джауари С.С., Басалова Н.А., Скрыбина М.Н., Александрович Н.А., Балабаньян В.Ю.,
Попов В.С., Ефименко А.Ю., Данилова Н.В., Мальков П.Г., Ткачук В.А., Карагяур М.Н.



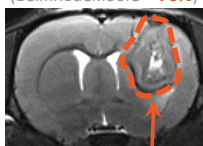
+ 20 мкл:

1. Секретом МСК
2. Контроль

% животных с неврологическими
нарушениями (11 сутки)

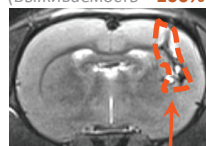


Контроль*
(Выживаемость – 70%)



$S_{повреждения} = 16.2\%$

Секретом МСК*
(Выживаемость – 100%)



5.6%

* - 11 сутки

Разработка препарата для лечения геморрагического инсульта на базе секрета мезенхимных стволовых клеток (МСК)

Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) являются одной из основных причин смертности и инвалидизации людей в мире. По этиологии и патогенезу выделяют две основные формы ОНМК: ишемическую и геморрагическую. Для более распространенной ишемической формы ОНМК (ишемический инсульт) существуют лекарственные препараты и достаточно эффективные терапевтические подходы. В то же время для ОНМК, ассоциированных с излиянием крови в паренхиму мозга (геморрагический инсульт), менее распространенных, но клинически более тяжелых, эффективного специфического лечения не существует.

Из данных литературы известно, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются ключевыми регуляторами процессов регенерации поврежденных тканей, при этом неоднократно было показано, что, в основном МСК реализуют свое стимулирующее действие на процессы регенерации через секрецию факторов роста, цитокинов, белков матрикса и пр. Терапевтическая активность МСК и продуктов их секреции (секретома) настолько значима, что предпринимаются попытки их использования для стимуляции регенерации тканей, в том числе периферических нервов и ткани мозга.

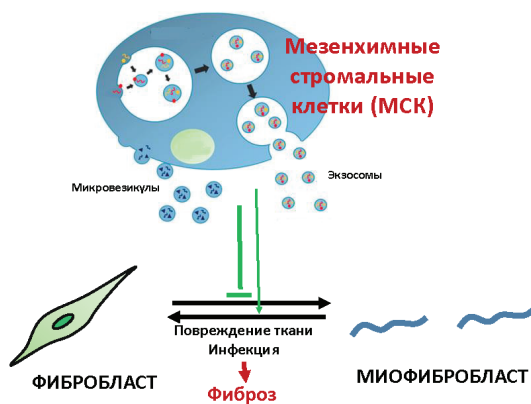
В данном исследовании нами был изучен нейропротективный потенциал секретома МСК на экспериментальной модели интрацеребральной гематомы у крыс. Секретом МСК вводили в область повреждения через 5 минут после моделирования интрацеребрального кровоизлияния по А.Н. Макаренко. За животными наблюдали в течение 14 дней после моделирования инсульта. Оценивали выживаемость, тяжесть неврологических дефицитов, объем повреждения головного мозга по данным МРТ и гистологического исследования.

Было установлено, что секретом МСК, введенный в область повреждения, предотвращает гибель экспериментальных животных и снижает тяжесть неврологических нарушений, а также уменьшает объем повреждения головного мозга, хотя и наблюдается видоспецифичность данного эффекта. Исследование механизма нейропротективного действия секретома МСК показало, что он способен стимулировать выживание нейронов в условиях глутамат-опосредованной нейротоксичности и снижать степень активации клеток микроглии, предотвращая прогрессирование вторичного повреждения ткани мозга. Полученные результаты позволяют рассматривать секретом МСК, как перспективный препарат для лечения геморрагического инсульта и других острых повреждений мозга.



Басалова Наталия Андреевна,
К.б.н., м.н.с. Институт
регенеративной медицины МНОЦ
МГУ имени М.В. Ломоносова

МСК подавляют фиброз за счет регуляции дифференцировки миофибробластов и их предшественников с помощью переноса специфических микроРНК в составе внеклеточных везикул



МикроРНК-29с и -129 в составе внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток способствуют разрешению фиброза легких через управление дифференцировкой миофибробластов и их предшественников

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) обладают способностью к регуляции фиброза, однако молекулярные механизмы данного эффекта остаются малоизученными. Известно, что ряд подходов к подавлению фиброза основан на подавлении активности миофибробластов и стимулировании их дифференцировки в нормальные тканеспецифичные клетки. Одними из ключевых молекул, регулирующих эти процессы, являются микроРНК, которые транспортируются преимущественно в составе внеклеточных везикул (ВВ-МСК). Поэтому в данной работе было исследовано влияние микроРНК в составе ВВ-МСК на дифференцировку миофибробластов в процессе развития фиброза *in vitro* и *in vivo*.

ВВ были выделены из кондиционированной среды МСК человека и охарактеризованы стандартными методами. Ингибирование исследуемых микроРНК было проведено путём трансфекции ВВ-МСК синтетическими олигонуклеотидами. Эффект от применения ВВ-МСК оценивали с использованием *in vitro* модели дедифференцировки миофибробластов человека (ИЦХ, вестерн-блоттинг, ОТ-ПЦР, модель контракции коллагенового диска) и *in vivo* модели индуцированного блеомицином фиброза лёгких у мышей C57Bl/6, с интратрахеальным введением ВВ-МСК через 14 дней после введения блеомицина.

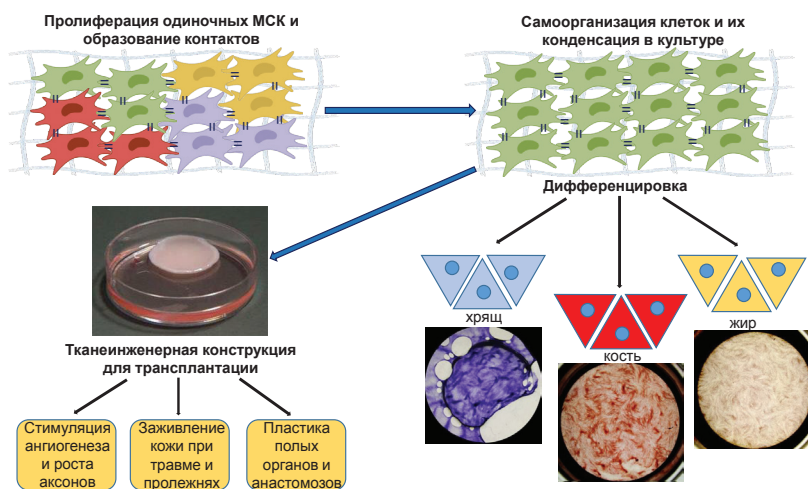
Мы показали, что у животных в группе с введением ВВ-МСК выраженность фиброза легких значительно уменьшилась, а площадь функциональной легочной ткани увеличилась на 40-45% по сравнению с контрольными группами. Мы предположили, что такое влияние ВВ-МСК на прогрессирование фиброза основано на их способности регулировать трансдифференцировку стромальных клеток в активированные фибробласты и миофибробласты - основные драйверы фиброза. Мы показали, что *in vitro* ВВ-МСК стимулировали дедифференцировку миофибробластов на морфологическом и функциональном уровнях за счет переноса специфических микроРНК. Мы продемонстрировали, что не одна микроРНК, а комплекс, состоящий из микроРНК-129 и -29с, оказал решающее влияние на наблюдаемые эффекты *in vitro* и *in vivo*. Данные микроРНК подавляют синтетическую активность клеток, уменьшая синтез коллагена I типа, а также способствуют дедифференцировке клеток, снижая количество компонентов фокальных контактов – винкулина, альфа-актинина 1 и 4 типа. Подавление микроРНК-129 и -29с в ВВ-МСК значительно снизило их антифибротический эффект *in vivo*, что привело к увеличению количества активированных фибробластов, миофибробластов и фибротических очагов в легких.

Таким образом мы показали, что комплекс специфических микроРНК, состоящий из микроРНК-29с и -129 и переносимый в составе ВВ-МСК, способен стимулировать дедифференцировку миофибробластов *in vitro* и *in vivo*, тем самым способствуя подавлению прогрессирования фиброза. Работа поддержана РФФИ (№20-04-60487 и №20-315-90120).



Нимирицкий Петр Петрович,
к.б.н., м.н.с., Институт
регенеративной медицины МНОЦ
МГУ имени М.В. Ломоносова

Постнатальные МСК способны к спонтанной конденсации, приводящей к изменению дифференцировочной судьбы



Самоорганизация путем мезенхимальной конденсации в клеточных пластах определяет дифференцировочную судьбу МСК

Важнейшей целью регенеративной медицины является восстановление микроархитектуры тканей как структурированных в пространстве клеточных сообществ. Формирование структуры тканей в онтогенезе задействует естественные механизмы самоорганизации клеток при их локальных взаимодействиях [1]. Для клеток мезенхимного ряда характерна самоорганизация путем конденсации, имеющая ключевое значение при органогенезе многих органов (кости, почки, зубы, мышцы и т.д.). Конденсация клеток опосредована их дифференциальной межклеточной адгезией, специфической миграцией, перестройками цитоскелета. Механизмы и роль спонтанной (без экзогенных воздействий) самоорганизации мультипотентных стромальных клеток (МСК) были исследованы в модели клеточных пластов (КП) [2]. Было показано, что самоорганизация приводит к формированию неоднородной в пространстве плотности клеточного состава, обеспечивает структурированное распределение клеток с разными свойствами, особенностями профиля транскрипции, метаболическими характеристиками. Более того, конденсация МСК при самоорганизации определяет их превалирующий тип дифференцировки. Было обнаружено, что конденсация МСК повышала эффективность их дифференцировки в остеогенном и хондрогенном, но не адипогенном направлениях. С использованием метода лазерной микродиссекции были препаративно выделены клетки, различные по степени вовлеченности в процесс конденсации. Далее, с помощью секвенирования РНК были установлены последствия конденсации на паттерн экспрессии генов, что позволило изучить эффекты компактизации и предположить её механизмы. Анализ показал, что клетки после конденсации имеют черты дифференцировки в остеогенном направлении: локальная активность щелочной фосфатазы, обогащенный коллагеном 1 типа внеклеточный матрикс, характерные черты метаболизма и др. Транскрипционные сдвиги при конденсации также включали активацию участников сигнального пути ГТФаз Rho, и подавление активности транскрипционного фактора SREBP - ключевого для адипогенеза. С использованием ингибиторного анализа было показано, что самоорганизация МСК в КП протекает путем Rho-зависимой конденсации, и активность сигнального пути Rho определяет формирование в изначально гомогенном конструкторе пространственной гетерогенности клеток. Конденсация МСК в клеточных пластах может рассматриваться как модель самоорганизации клеток при восстановлении микроархитектуры тканей и органов после повреждения. Работа была выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология»

Симпозиум 2 Регуляция дифференцировки мультипотентных стволовых клеток

Симпозиум сфокусирован на молекулярных механизмах регуляции дифференцировки и трансдифференцировки стволовых клеток в процессах репарации и регенерации тканей, включая костную и жировую ткань, а также миокард.

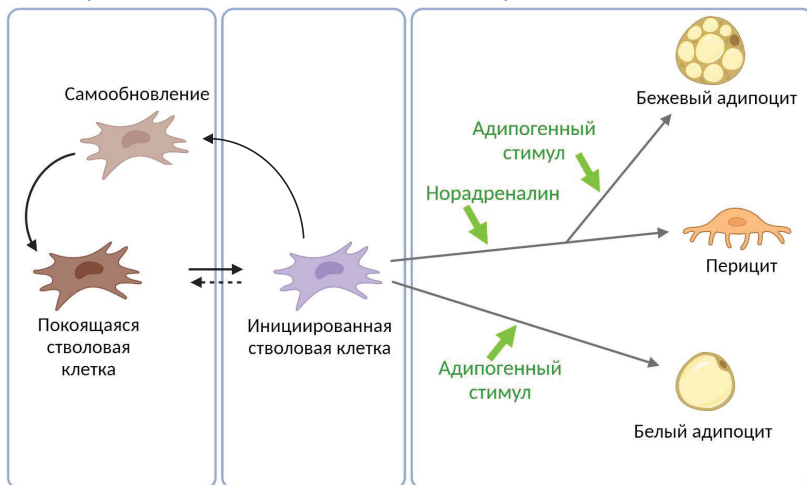
Доклады:

- «Функциональная гетерогенность мультипотентных стволовых клеток»
Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич
- «Участие Т-кадгерина в регуляции обновления и дифференцировки МСК жировой ткани»
Рубина Ксения Андреевна
- «Роль малых регуляторных популяций в контроле функций МСК жировой ткани»
Кулебякин Константин Юрьевич
- «Рецептор урокиназы как регулятор функций прогениторных клеток и развития диффузного фиброза миокарда»
Дергилев Константин Владимирович
- «Особенности цитокинового профиля МСК в условиях провоспалительного микроокружения»
Горностаева Александра Николаевна
- «Молекулярные механизмы участия МСК в развитии артериальной гипертензии при ожирении»
Чечехин Вадим Игоревич



Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич,
Факультет фундаментальной
медицины МГУ имени М.В.
Ломоносова

Ключевые этапы определения направления дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток



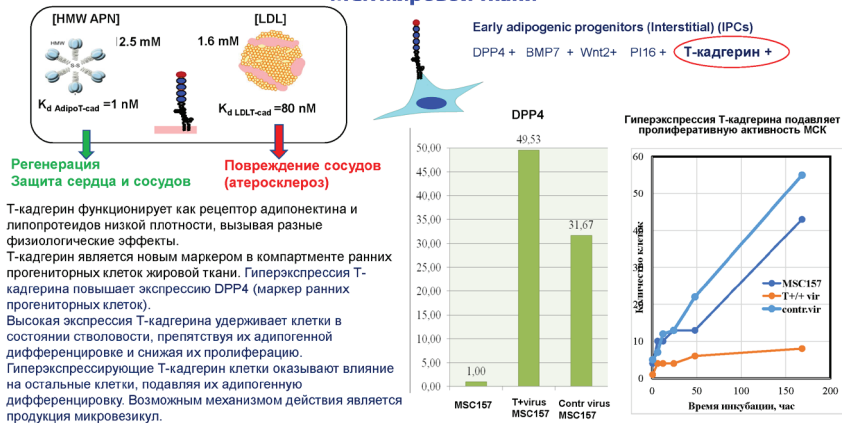
Функциональная гетерогенность мультипотентных стволовых клеток

Накопление избыточного веса и ожирение являются одними из ключевых проблем современной медицины. Проблема ожирения вызвана, главным образом, преобладанием неправильной культуры питания вкупе с сидячим образом жизни и работы большинства людей и все возрастающим постоянным психо-эмоциональным стрессом. Кроме того, генетическая предрасположенность или нарушения метаболизма могут приводить к развитию ожирения. Ассоциированные с ожирением заболевания, такие как сахарный диабет, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания являются одними из ведущих причин инвалидизации и потери трудоспособности людей. Ключевую роль в процессе развития ожирения играет нарушение организменных процессов обновления и поддержания здорового состояния жировой ткани. При этом в жировой ткани нарушаются процессы закладки новых адипоцитов из резидентных стволовых клеток (мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, МСК). В результате в жировой ткани накапливаются крупные старые гипертрофированные адипоциты, демонстрирующие нарушенную чувствительность к гормональным сигналам и отсутствие способности к продукции важных для метаболического здоровья ткани адипокинов. С другой стороны, в жировой жировой ткани могут закладываться так называемые бежевые адипоциты. Это клетки, родственные белым адипоцитам, но по своим функциям и морфологии похожие на бурые адипоциты. Они способны сжигать жиры, рассеивая энергию в тепло. Они эффективно редуцируют объем жировой ткани без накопления продуктов метаболизма триглицеридов, что происходит в случае повышения каталитической активности белых адипоцитов. Таким образом, для предотвращения развития и прогрессии ожирения перспективным является подход к стимуляции процессов закладки новых молодых белых адипоцитов в жировой ткани и индукции их дифференцировки в бежевые адипоциты. В данной работе мы показали уникальный сигнальный феномен гетерологической сенситизации МСК, при котором появляется группа клеток с повышенной чувствительностью к норадреналину [1,2]. При их стимуляции появляется группа «иницированных» к дифференцировке МСК. Для того, чтобы выбрать направление дифференцировки между белыми и бежевыми адипоцитами, МСК должны войти в это инициированное состояние, из которого они уже коммитируются и направляются в выбранное направление. Работа поддержана грантом РФФИ № 21-15-00311 «Механизмы межклеточной коммуникации в поддержании гомеостаза и регуляции обновления жировой ткани».



Рубина Ксения Андреевна,
факультет фундаментальной
медицины МГУ имени М.В.
Ломоносова

Участие Т-кадгерина в регуляции обновления и дифференцировки МСК жировой ткани



Участие Т-кадгерина в регуляции обновления и дифференцировки МСК жировой ткани

Физиологическая экспансия жировой ткани в норме происходит за счет гиперплазии адипоцитов, то есть формирования новых адипоцитов за счет пролиферации и дифференцировки стволовых/прогениторных клеток. При патологии увеличение жировой ткани происходит за счет гипертрофии существующих адипоцитов. Нарушение процессов обновления и дифференцировки клеток жировой ткани при ожирении, инсулинорезистентности и метаболическом синдроме сопровождается нарушением процессов обновления адипоцитов, воспалением, изменением продукции гормонов, прежде всего адипонектина, регуляторных микроРНК, что оказывает системные негативные эффекты на весь организм.

Т-кадгерин является навигационным рецептором, негативно регулирующим рост сосудов и нервов. Помимо этого, Т-кадгерин является рецептором липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и высокомолекулярного адипонектина (HMW адипонектин), что вызывает разные физиологические эффекты. Механизмы участия Т-кадгерина в регуляции процессов обновления жировой ткани и регуляции продукции адипонектина до сих пор не известны.

Обнаружено, что добавление ЛНП, но не HMW адипонектина, в среду культивирования клеток МСК (мезенхимные стромальные/стволовые клетки) человека подавляет адипоцитную дифференцировку МСК.

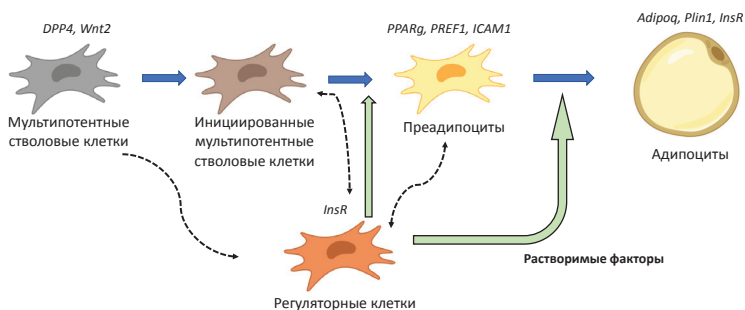
Получены данные кластеризации клеток по схожести профилей экспрессии. Библиотеки транскриптов клеток МСК, выделенных из подкожной жировой ткани здорового донора и этих же клеток, после индукции адипоцитарной дифференцировки получены на платформе «10x Chromium», scRNA-seq— Illumina NovaSeq 6000. Биоинформатический анализ показал, что доля клеток, экспрессирующих Т-кадгерин, после индукции дифференцировки снижается в 2 раза. Клетки, экспрессирующие Т-кадгерин локализуются в кластере с высоким уровнем экспрессии генов стволовости и маркеров ранних прогениторных клеток, в том числе DPP4. Гиперэкспрессия Т-кадгерина с использованием лентивирусной конструкции в первичной культуре МСК человека повышает экспрессию DPP4, удерживает клетки в состоянии стволовости, препятствуя их адипогенной дифференцировке и снижая их пролиферацию. Гиперэкспрессирующие Т-кадгерин клетки оказывают влияние на остальные клетки в культуре, подавляя их адипогенную дифференцировку. Возможным механизмом действия является продукция микровезикул.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли Т-кадгерина в процессах поддержания состояния стволовости прогениторных/стволовых клеток жировой ткани и регуляции их дифференцировки в адипогенном направлении.



Кулебякин Константин Юрьевич,
К.б.н., доцент, Факультет
фундаментальной медицины МГУ
им. М.В. Ломоносова

В составе жировой ткани существует особая субпопуляция клеток, отвечающая за регуляцию адипогенеза



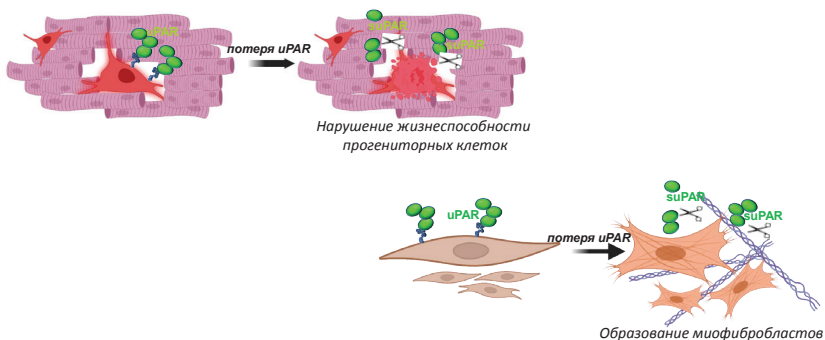
Роль малых регуляторных популяций в контроле функций МСК жировой ткани человека

Обновление жировой ткани обеспечивается особой группой постнатальных стволовых клеток - мезенхимными стволовыми клетками. Эти клетки являются предшественниками адипоцитов во взрослом организме, продуцируют внеклеточный матрикс, определяющий структуру ткани, а также контролируют тканевой метаболизм за счет продукции паракринных и аутокринных сигнальных молекул. Популяция МСК является крайне гетерогенной в функциональном плане. Мы показали, что в ее состав входят субпопуляции клеток, различные на функциональном уровне и по чувствительности к гормонам-регуляторам. При этом клетка, воспроизводимо отвечающая на один гормон, оказывается нечувствительной к другим гормонам. Недавно была описана особая субпопуляция МСК, подавляющая адипогенную дифференцировку других клеток жировой ткани посредством продукции паракринных сигналов. Это позволяет предположить, что в популяции МСК могут существовать особые регуляторные субпопуляции клеток, обладающие чувствительностью к определенным гормонам и способные "передавать" гормональный сигнал клеткам через продукцию паракринных факторов. Используя метод проточной цитофлуорометрии, мы смогли выделить малую субпопуляцию клеток, несущих на своей поверхности рецептор к инсулину. Несмотря на то, что данные клетки составляют менее 15% от общего числа МСК, оказалось, что удаление этих клеток из популяции практически полностью лишает МСК способности дифференцироваться в клетки жировой ткани. Примечательно, что сами по себе клетки, несущие на поверхности рецептор к инсулину и способные воспринимать сигналы от основного регулятора закладки новых адипоцитов, оказались не способны к адипогенной дифференцировке. При этом в условиях сокультивирования, когда группы клеток, имеющие и не имеющие инсулиновый рецептор на своей поверхности, были разделены полупроницаемой мембраной, препятствующей прямым контактам между клетками, но позволяющей передачу растворимых факторов, таких как сигнальные белки, микроРНК и клеточные везикулы, в популяции, не несущей инсулиновый рецептор, происходило полное восстановление способности к дифференцировке в адипоциты. Это позволяет предположить, что малая популяция, несущая инсулиновый рецептор, представляет собой специализированные клетки-регуляторы адипогенной дифференцировки, которые сами не дифференцируются в жировые клетки, но управляют и "дирижируют" остальными клетками в популяции, определяя формирование новых адипоцитов. Работа выполнена при поддержке фонда РФ (Грант № 21-15-00311).



Дергилев Константин Владимирович,
к.м.н., в.н.с. ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России

**Рецептор активатора плазминогена урокиназного типа (uPAR)
как регулятор функций прогениторных клеток и развития
диффузного фиброза миокарда**



Рецептор урокиназы как регулятор функций прогениторных клеток и развития диффузного фиброза миокарда

Активатор плазминогена урокиназного типа и его рецептор (uPAR) образуют интегрированный на клеточной мембране мультимолекулярный комплекс, который выполняет как протеолитическую, так регуляторные функции, необходимые для поддержания тканевого гомеостаза.

Цель: исследовать участие uPAR в реализации ангиогенных свойств васкулогенных клеток-предшественниц (ВКП) и развитии кардиального фиброза.

В работе использованы ВКП, полученные из сердец uPAR^{-/-} и мышей дикого типа, и охарактеризованные с помощью методов проточной цитофлуориметрии, ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинга, иммуноцитохимии, микроэрей анализа, подходов для оценки ангиогенных свойств (tube assay, трансплантация клеток в составе матригеля). Исследование уровня васкуляризации миокарда и фиброза выполнялось с помощью иммуногистохимических и гистологических методов с последующим анализом в программе Image J. Диастолическая функция сердца оценивалась с помощью ЭХОКГ.

Сравнительное исследование показало, что в сердце uPAR^{-/-} животных наблюдается снижение числа капилляров и артериол в сравнении с животными дикого типа. Мы также обнаружили, что у uPAR^{-/-} мышей наблюдается снижение числа васкулогенных клеток-предшественниц (ВКП). Мы показали, что uPAR^{-/-} ВКП имеют признаки сниженной жизнеспособности, более легко способны вступать в апоптоз, имеют сниженную секрецию проангиогенных факторов роста (VEGF, ангиогенинов и ангиопоэтинов) и подавленную способность к ангиогенезу *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, у uPAR^{-/-} мышей снижение ангиогенного поведения клеток сочеталось с признаками интерстициального фиброза в сочетании с развитием диастолической дисфункции, чего не наблюдалось у животных дикого типа.

Таким образом, дефицит uPAR ведет к нарушению ангиогенного поведения ВКП и васкулопатии, что может лежать в основе развития интерстициального фиброза в сердце. uPAR^{-/-} мыши могут рассматриваться в качестве модели для изучения молекулярных механизмов развития кардиального фиброза и недостаточности с сохраненной фракцией выброса.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 21-15-00327



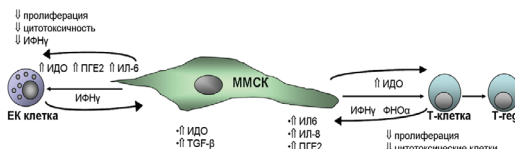
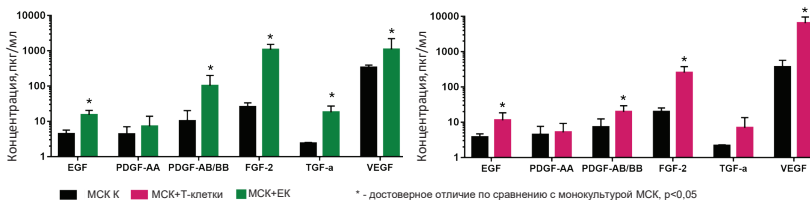
Горностаева Александра Николаевна,
к.б.н. с.н.с. ГНЦ РФ ИМБП РАН



Паракринный профиль МСК при взаимодействии с активированными иммунными клетками



- МСК жировой ткани человека, 3 пассажа
- Т-клетки/ Естественные киллеры (ЕК) активированные:
- фитогемагглютинином (ФГА) IL-2+IL-15
- Соотношение МСК/иммуноциты 1:10
- 72 часа сокультивирования



В ответ на провоспалительное микроокружение МСК выделяют широкий спектр растворимых медиаторов, включающий в себя, как провоспалительные цитокины, так и факторы роста и иммуносупрессивные медиаторы. Уровень продукции этих факторов зависит от типа иммунных клеток,

Особенности цитокинового профиля МСК в условиях провоспалительного микроокружения

МСК (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки) являются востребованным инструментом регенеративной медицины. Они обладают высокой пролиферативной и паракринной активностью, иммуноуклончивостью, способностью к мультилинейной дифференцировке и модулируют иммунный ответ. Это делает возможным применение аллогенных МСК для регенерации тканей и снижения острых воспалительных процессов. Терапевтический эффект МСК чаще всего достигается за счёт их паракринной активности, при этом состав секрета в большей степени зависит от экзогенных факторов.

В исследовании изучался паракринный профиль МСК в условиях провоспалительного микроокружения. МСК жировой ткани человека 72 часа сокультивировали с мононуклеарами периферической крови (МНК) человека и популяциями ЕК и Т-клеток. МНК и Т-клетки стимулировали фитогемагглютинином 10 мкг/мл, а ЕК – IL-2 и IL-15 (20 и 10 нг/мл соответственно). При сокультивировании существенно ($p < 0,05$) повышалась секреция МСК факторов роста: FGF-2, fraktalkine, eotaxin, G-CSF, VEGF. При этом продукция EGF, TGF- α и PDGF-AB/BB не изменялась. Концентрация GRO, IL-6 и IL-8 в среде от сокультуры возрастала по сравнению с монокультурой МСК. В экспериментах с сепарированными популяциями ЕК и Т-клеток удалось установить, что продукция GRO увеличивается за счёт вклада МСК. С помощью ПЦР-анализа показано, что экспрессия генов IL6 и IL8 в МСК после сокультивирования увеличивалась в 10 и 200 раз, соответственно. Кроме того, выявлено повышение экспрессии генов, кодирующих иммуномодуляторные медиаторы IDO и PGE2, а также секреции EGF и PDGF-AB/BB при взаимодействии с обоими типами клеток, а TGF- α – только с ЕК. При этом кратность увеличения продукции PDGF-AB/BB и FGF-2 МСК в сокультуре с ЕК была в 5 раз больше, чем при взаимодействии с Т-клетками, а увеличение VEGF было более выражено (в 6 раз) в сокультуре МСК и Т-клеток.

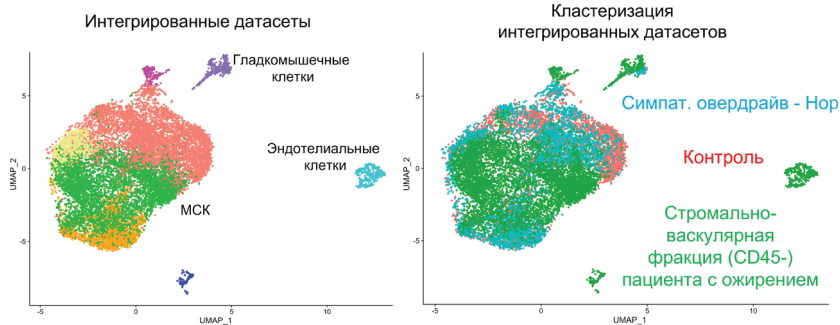
Таким образом, в ответ на взаимодействие с провоспалительно-активированными иммунными клетками МСК выделяют широкий спектр растворимых медиаторов, модулирующих воспаление и стимулирующих регенерацию. Уровень продукции этих факторов зависит от типа иммунных клеток, с которым происходит взаимодействие.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-29-04026.



Чечехин Вадим Игоревич,
аспирант, Факультет
фундаментальной медицины МГУ
им.М.В. Ломоносова

Контрактильные клетки, образующиеся при действии норадреналина после симпатического овердрайва по транскриптому похожи на ГМК



Молекулярные механизмы участия МСК в развитии артериальной гипертензии при ожирении

Артериальная гипертензия является одним из самых распространенных сердечно-сосудистых заболеваний в мире. При этом порядка 60-70% случаев артериальной гипертензии ассоциировано с ожирением. Ожирение связано с усилением симпатической иннервации, что приводит к повышению артериального давления. Однако не все случаи ожирения приводят к развитию артериальной гипертензии. Контроль функций жировой ткани и ее сосудов осуществляют мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), популяция которых включает перicyты. В качестве модели усиления симпатической стимуляции мы использовали двукратное добавление норадреналина с интервалом в 6 часов. Ранее мы показали, что стимуляция МСК в этих условиях приводит к усилению чувствительности клеток к норадреналину. В данной работе мы изучали, как влияет норадреналин на функциональную активность МСК и их способность к контракции.

Используя иммуногистохимическое окрашивание жировой ткани, мы определили, что $\alpha 1A$ -АР локализуется не в ГМК и не в эндотелии, а в МСК, располагающихся рядом с симпатическими нервными волокнами. Способность к повышению в ответ на действие норадреналина чувствительности клеток к контрактильным сигналам коррелирует с уровнем артериального давления у пациентов с ожирением. Используя анализ транскриптома одиночных клеток, мы показали, что после двукратной стимуляции норадреналином происходит увеличение количества муральных и фибробластоподобных клеток. Более того, при двукратном действии норадреналина происходит значительное усиление контракции МСК коллагеновых дисков. Через 6 часов после стимуляции норадреналином в МСК повышается уровень $\alpha 1A$ -АР. При этом происходит увеличение трансляции $\alpha 1A$ -АР, но уровень мРНК данного белка не изменяется. Используя ингибиторный анализ, мы показали, что норадреналин повышает $\alpha 1A$ -АР через каскад $\beta 3$ -АР/аденилатциклаза/цАМФ/РКА. При этом РКА при действии норадреналина не входит в ядро клетки, а, вероятно, действует на цитоплазматические мишени.

Таким образом, сенситизация $\alpha 1A$ -АР в МСК при действии норадреналина запускается сигнальным каскадом $\beta 3$ -АР/аденилатциклаза/цАМФ/РКА и активацией трансляции, но не транскрипции. При двукратном воздействии норадреналином в МСК увеличивается доля контрактильных муральных и фибробластоподобных клеток. Исследование выполнено при поддержке РФФ грант № 21-15-00311.

**Издано при поддержке
Российского научного фонда
грант №19-75-30007**



**ШКОЛА
МОЛОДОГО
УЧЕНОГО РНФ**