

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и молекулярной медицины

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Калинина Наталья Игоревна

**Официальные
оппоненты:** **Авдонин Павел Владимирович,**
доктор биол. наук, проф., Институт биологии развития им.
Н.К. Кольцова РАН, лаборатория физиологии рецепторов и
сигнальных систем, заведующий лабораторией

Мазуров Алексей Владимирович,
доктор мед. наук, проф., ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский центр кардиологии»
Минздрава РФ, лаборатория клеточной адгезии,
заведующий лабораторией

Ведущая организация: ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

Защита состоится «5» декабря 2019 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 19, стр. 8. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан «__»_____ 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

По современным представлениям жировая ткань (ЖТ) 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 (Rosen & Spiegelma, 2014). 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 (Schwalie et al., 2018). 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 (рис 1). 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 Gαq/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 Gα-субъединицы как G12/13 и Gi, димер Gβγ, 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 (Carey, 2013).

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 (Engeli et al., 2000). Оказалось, что локальная РАС участвует в поддержании гомеостаза тканей и их регенерации после повреждения (Bernasconi and Nystrom, 2018). Более того, была выявлена корреляция активности РАС и развития ожирения, а взаимодействие Ang II с AT1-рецептором приводит к подавлению адипогенной дифференцировки (Janke et al., 2002). Эти данные позволили предположить, что Ang II может регулировать функциональную активность МСК жировой ткани человека посредством взаимодействия с AT1 и AT2-рецепторами.

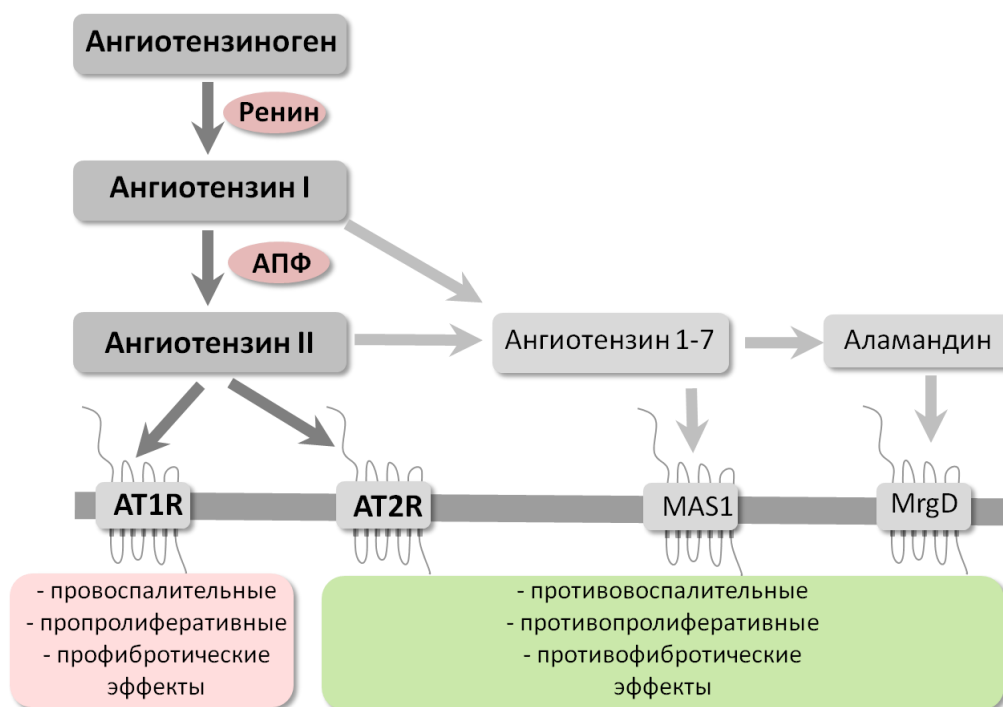


Рисунок 1. Ренин-ангиотензиновая система (РАС).

Цель исследования

Изучить влияние ангиотензина II на функциональную активность МСК жировой ткани человека

Задачи исследования

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

Впервые проведено подробное исследование компонентов РАС в МСК ЖТ человека и обнаружена гетерогенность в экспрессии и функционировании рецепторов к ангиотензиновым пептидам.

Впервые обнаружено влияние локального Ang II на адипогенную дифференцировку отдельных субпопуляций МСК ЖТ.

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 мышинной 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.

Степень достоверности и апробация результатов

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.

Публикации

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.

Объем и структура 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.

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В работе использовали первичные культуры МСК подкожной жировой ткани человека и клетки нейробластомы мыши линии Neuro2A. МСК выделяли из подкожной жировой клетчатки здоровых доноров при абдоминальных хирургических операциях по описанной методике (Zuk et al., 2002). Первичную культуру МСК растили в среде Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (HyClone) с добавлением 10% AdvanceSTEM Growth Supplement (HyClone), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 250 нг/мл амфотерицина В (HyClone). При достижении клетками 90% монослоя, культуру МСК пассировали с использованием раствора ферментов HyQTase (HyClone). Для экспериментов использовали МСК 2-5 пассажей. Клетки нейробластомы мыши линии Neuro2A культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла с 4,5 г/л глюкозы (DMEM, ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, HyClone), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (HyClone) при 37°C с 5% CO₂. При пассировании клетки промывали раствором Версена (ПанЭко) и добавляли раствор 0,25% трипсина (HyClone).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Распределение рецепторов к ангиотензиновым пептидам в клетках жировой ткани *in situ* и *in vitro* исследовали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов жировой ткани или культивируемых МСК антителами против AT1-рецептора (rabbit polyclonal, ThermoFisher Scientific), AT2-рецептора (rabbit polyclonal, Alomon) и MAS1-рецептора (rabbit polyclonal, Abcam) в сочетании с антителами против маркерных антигенов эндотелиальных и стромальных клеток (CD31, CD90 и PDGFR β (mouse, BD Pharmingen) по опубликованной ранее методике (Lopatina et al., 2011).

Проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток (FACS). Экспрессию компонентов PAC и фенотип МСК анализировали с помощью окрашивания специфическими антителами против AT1-рецептора (Rabbit polyclonal, ThermoFisher Scientific), AT2-рецептора (Mouse, APC-conjugated, R&D Systems), АПФ (Mouse, Abcam), CD45 (Mouse, PE-Cy7-conjugated), CD73 (Mouse, PE-conjugated), CD90 (Mouse, PE-Cy5-conjugated) и CD105 (Mouse, PerCP-Cy5.5-conjugated, BD Pharmingen). Для идентификации живых клеток использовали 7-актиноаминоацин D (Cell Viability Solution, BD Pharmingen). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре LSR Fortessa (BD Pharmingen) в программе FlowJo (FLOWJO, LLC), целевые субпопуляции МСК выделяли с помощью прибора BD FACSAria III (BD Pharmingen).

Ca²⁺-imaging. МСК высаживали в низкой плотности и нагружали флуоресцентным красителем Fluo8 (Abcam). Ca²⁺-ответы при добавлении Ang II и лозартана измеряли в одиночных клетках с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti с камерой Andor iXon 897 (Andor Technology) и анализировали в программах NIS-Elements (Nikon) и ImageJ. Изменения концентрации цитоплазматического Ca²⁺ выражали относительно базового уровня Ca²⁺ ($\Delta F/F_0$).

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК из клеток выделяли и очищали с помощью набора Direct-zol RNA MiniPrep или Direct-zol RNA MicroPrep (Zymo Research) – в зависимости от количества клеток в эксперименте. Первую цепь кДНК синтезировали с Oligo(dT)20 праймерами, используя SuperScript[®] III First-Strand

Synthesis System (Life Technologies). Количественный ПЦР в реальном времени проводили в трех повторах для каждого образца с помощью смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген) и прибора ДТ-96 (ДНК-технология). Уровень экспрессии генов интереса рассчитывали относительно уровня экспрессии RPL13a методом сравнительного порогового Ct.

Адипогенная дифференцировка. МСК дифференцировали в адипоциты с помощью набора AdvanceSTEM adipogenic differentiation medium (HyClone). Уровень мРНК генов адипогенеза определяли через 1 неделю, а накопление жировых капель - через 3 недели. Жировые капли визуализировали с помощью масляного красного О (Merck Millipore) и микроскопа Leica DMI6000B (камера DFC420 C). В 10-ти полях зрения для каждой экспериментальной точки с помощью программы MetaMorph 7.1 подсчитывали процент клеток с яркими жировыми каплями.

Обработка МСК Ang II и ингибиторами к компонентам PAC. В работе использовали следующие реактивы: Ang II (Abcam, 0.1 мкМ), ингибитор АПФ эналаприлат (Abcam, 10 мкМ), ингибитор AT1-рецептора лозартан (Abcam, 1 мкМ), ингибитор AT2-рецептора PD123319 (Tocris, 1 мкМ). При адипогенной дифференцировке Ang II и ингибиторы добавляли при каждой смене дифференцировочной среды. При измерении Ca^{2+} -ответов проводили короткие серийные добавки Ang II с промежуточными промывками раствором Хенкса. При оценке нейротрофической активности МСК инкубировали с Ang II и ингибиторами 1 час, а затем отмывали раствором Хенкса. Ингибиторы во всех экспериментах добавляли за 30 мин -1 час до добавления Ang II.

Определение нейротрофической активности МСК. Клетки Neuro2A дифференцировали в псевдоуниполярные нейроны с помощью суточной депривации в среде с 1% FBS и наносили на них кондиционированную в течение 1 суток среду от МСК. Для положительного контроля использовали фактор роста нервов (NGF) мыши (50 нг/мл), для отрицательного – среду DMEM с 1% FBS. Через три дня с помощью микроскопа Leica DMI6000B (камера DFC 350 FX) и программы MetaMorph 7.1 измеряли среднюю длину нейритов для 500-600 клеток в каждой экспериментальной точке. Уровень мРНК нейротрофических факторов и факторов роста в МСК измеряли через 6 часов после обработки Ang II.

Получение кондиционированной среды для протеомного анализа. МСК отмывали от сыворотки и культивировали в бессывороточной среде роста в течение 48 часов. К полученной кондиционированной среде добавляли 2 мМ PMSF и 5мМ ЭДТА и 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 тандемной масс-спектрометрии.

Статистическая обработка данных. 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. Все данные приведены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего (standard error, SE) или \pm стандартное отклонение (standard deviation, SD).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

С помощью иммуногистохимического окрашивания мы показали, что клетки жировой ткани человека экспрессируют рецепторы к Ang II – AT1, AT2 и рецептор к Ang 1-7 – MAS1 (рис. 2).

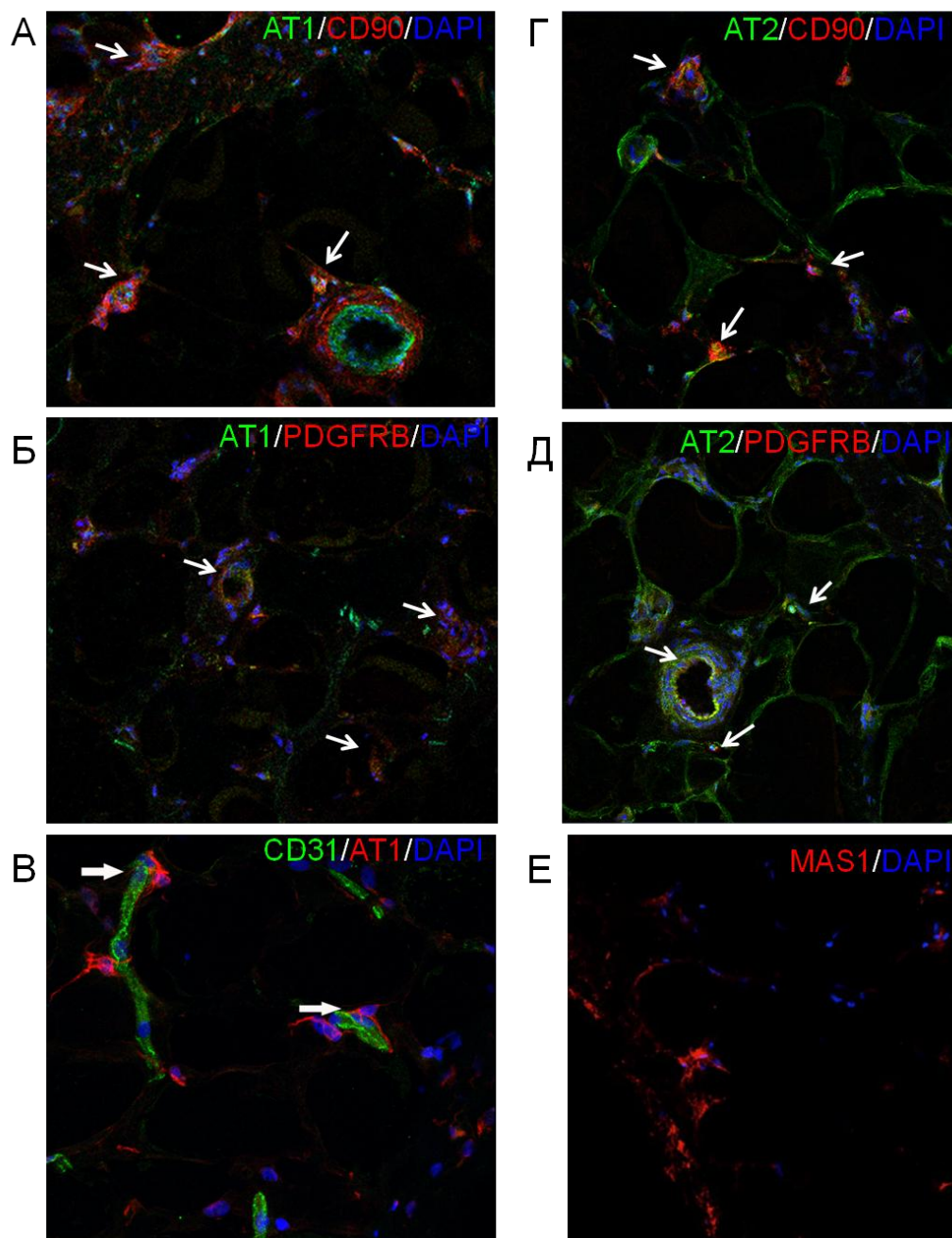


Рисунок 2. Экспрессия рецепторов к ангиотензиновым пептидам в клетках жировой ткани человека. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов жировой ткани антителами против AT1-рецептора (А, Б, В), AT2-рецептора (Г, Д), MAS1-рецептора (Е), стромальных маркеров CD90 (А, Г) и PDGFRβ (Б, Д), эндотелиального 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 МСК ЖТ *in vivo*.

Для того чтобы установить фенотип клеток, содержащих ангиотензиновые рецепторы, было проведено двойное иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов жировой ткани антителами против ангиотензиновых рецепторов в сочетании с антителами против маркерных антигенов стромальных клеток (CD90, PDGFR β) и эндотелия кровеносных сосудов (CD31) (рис. 2). Наиболее представлен в жировой ткани AT1-рецептор, который соэкспрессируется с CD90 и PDGFR β и содержится практически во всех стромальных клетках, а также присутствует в клетках субэндотелиального слоя сосудов рядом с CD31⁺ эндотелиальными клетками (рис. 2 А-В). Доля клеток, содержащих AT2- и MAS1-рецепторы, оказалась существенно меньше. При этом AT2-рецептор также был обнаружен в стромальных клетках и в клетках сосудистой стенки (рис. 2 Г-Е). Таким образом, клетки жировой ткани, экспрессирующие рецепторы к ангиотензиновым пептидам по локализации и наличию стромальных маркеров соответствуют МСК. Поэтому вероятно, что функциональная активность МСК ЖТ может регулироваться ангиотензиновыми пептидами *in vivo*.

Чтобы описать РАС в МСК более подробно, мы выделили МСК из жировой ткани и в последующих экспериментах изучали их *in vitro* в виде первичной культуры клеток. 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 и показали, что среди белков, секретируемых МСК ЖТ, присутствуют классические компоненты локальной РАС: ангиотензиноген и АПФ (его секретируемая форма). Кроме того, МСК секретируют такие протеазы, как ангиотенгиназа С (PRCP), катепсины В и D, которые также могут быть участниками локальной РАС и способствовать синтезу различных ангиотензиновых пептидов (табл. 1).

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	поренин \rightarrow ренин
P07339	катепсин D	9/10	15,44 \pm 8,29	Agt \rightarrow AngI

С помощью иммуноцитохимического окрашивания и проточной цитофлуориметрии мы показали, что МСК ЖТ в культуре экспрессируют рецепторы к Ang II: практически все клетки содержат AT1-рецептор (рис. 3 А, Д) и 5,7 \pm 1,7% МСК содержат AT2-рецептор (рис. 3 Б, В, Е). Кроме того, практически все МСК содержат мембранный АПФ (рис. 3 Г). Таким образом, 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.

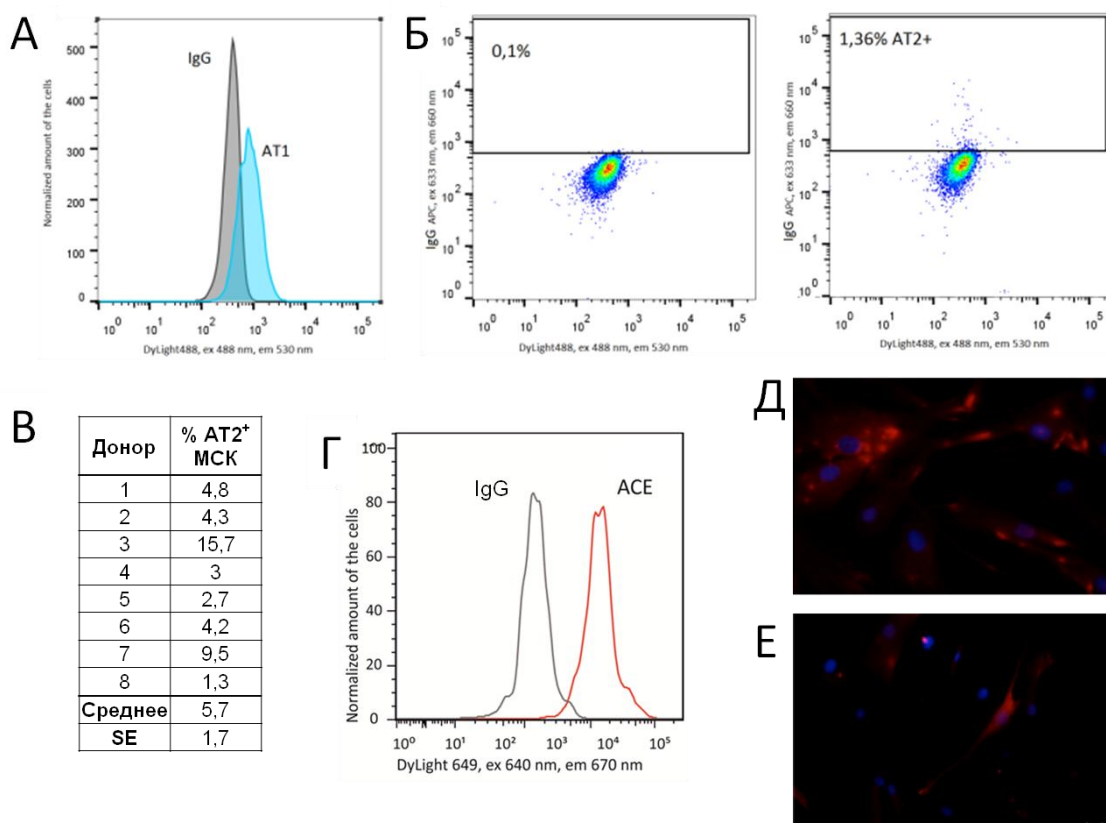


Рисунок 3. МСК ЖТ экспрессируют рецепторы к Ang II и мембранный АПФ *in vitro*. Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии (окраска на льду, А-Г) и иммуноцитохимического окрашивания (Д,Е). А, Д – окраска AT1-рецепторов; Б, Е – окраска AT2-рецепторов; В – процент AT2⁺-клеток в МСК различных доноров; Г – окраска мембранного АПФ.

Чтобы определить, функциональна ли локальная РАС в МСК, мы посмотрели, активны ли в них AT1-рецептор. Активность оценивали по кальциевой сигнализации: МСК нагружали красителем, флуоресценция которого пропорциональна концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Затем добавляли к клеткам Ang II и антагонист AT1-рецептора лозартан и наблюдали формирование Ca^{2+} -ответов. Оказалось, 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 лозартаном (рис. 4). 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 (Vinson et al., 1995; Nooh et al., 2017). 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.

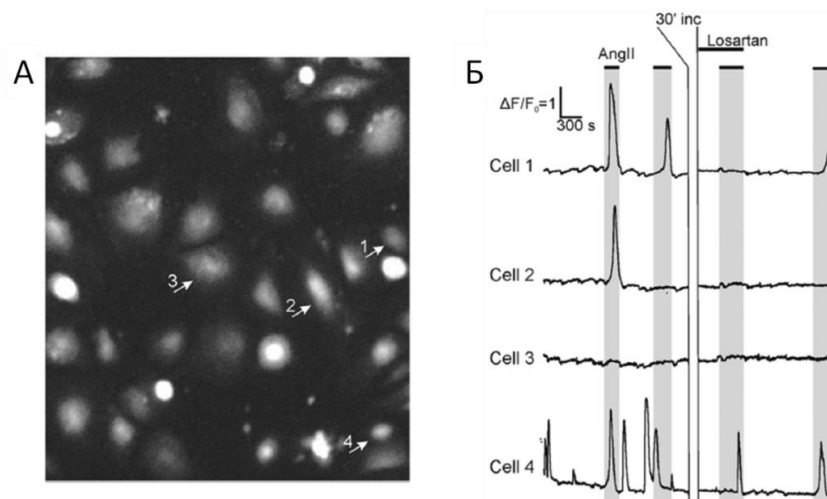


Рисунок 4. МСК ЖТ экспрессируют функционально активные AT1-рецепторы. Репрезентативные данные по флуоресценции Fluo8-нагруженных МСК (А) и записей Ca^{2+} -ответов (Б) после добавления Ang II и антагониста AT1-рецепторов лозартана.

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. 5).

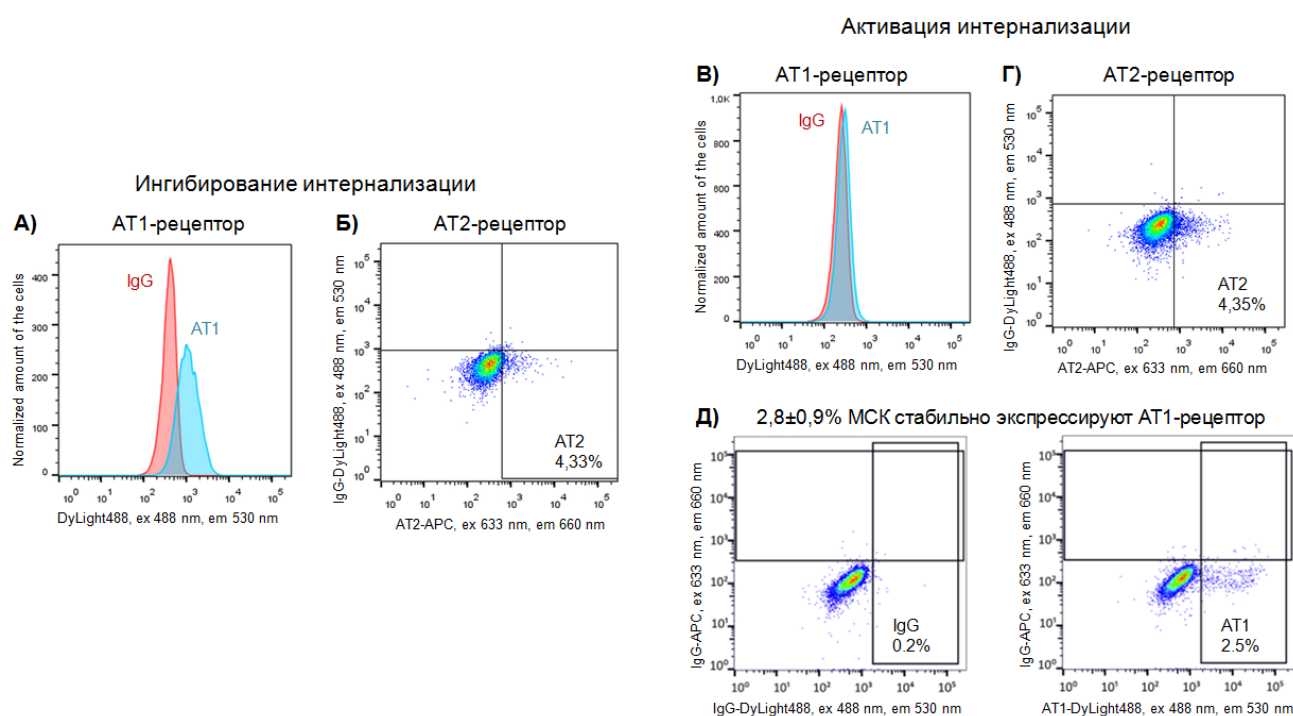


Рисунок 5. Сравнение окраски рецепторов к Ang II при ингибировании интернализации и при её активации. Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии. Ингибирование интернализации – окраска на льду, активация интернализации – окраска при комнатной температуре.

Оказалось, что окрашивание при комнатной температуре никак не влияет на представленность АТ2-рецепторов (рис. 5 А, В), но действительно вызывает интернализацию практически всех АТ1-рецепторов (рис. 5 Б, Г). При этом есть субпопуляция МСК, в которой АТ1-рецепторы не интернализуются и остаются стабильно экспонированными на поверхности клеток. Процент АТ1-стабильно экспрессирующих МСК варьирует между донорами, но в среднем составляет $2,8 \pm 0,9\%$ (рис. 5 Д) и близок к проценту МСК, экспрессирующих АТ2-рецептор ($5,7 \pm 1,7\%$).

Далее мы провели двойное окрашивание АТ1- и АТ2-рецепторов в условиях активации интернализации и с помощью проточной цитофлуориметрии проанализировали их созэкспрессию. Оказалось, что все АТ1-стабильно экспрессирующие МСК созэкспрессируют АТ2-рецептор (рис. 6 Б, Г, Д). Причем, верно и обратное: АТ2-рецепторы экспрессируются только на АТ1-стабильно экспрессирующих МСК (рис. 6 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 (AbdAlla et al., 2001; Yang et al., 2012). Возможно, в таких гетеродимерах АТ2-рецептор блокирует интернализацию АТ1-рецепторов и именно поэтому АТ1-рецептор стабильно экспонирован на мембране только тех МСК, которые созэкспрессируют АТ2-рецептор. Поэтому далее мы будем описывать АТ1-стабильно экспрессирующие МСК как АТ2⁺.

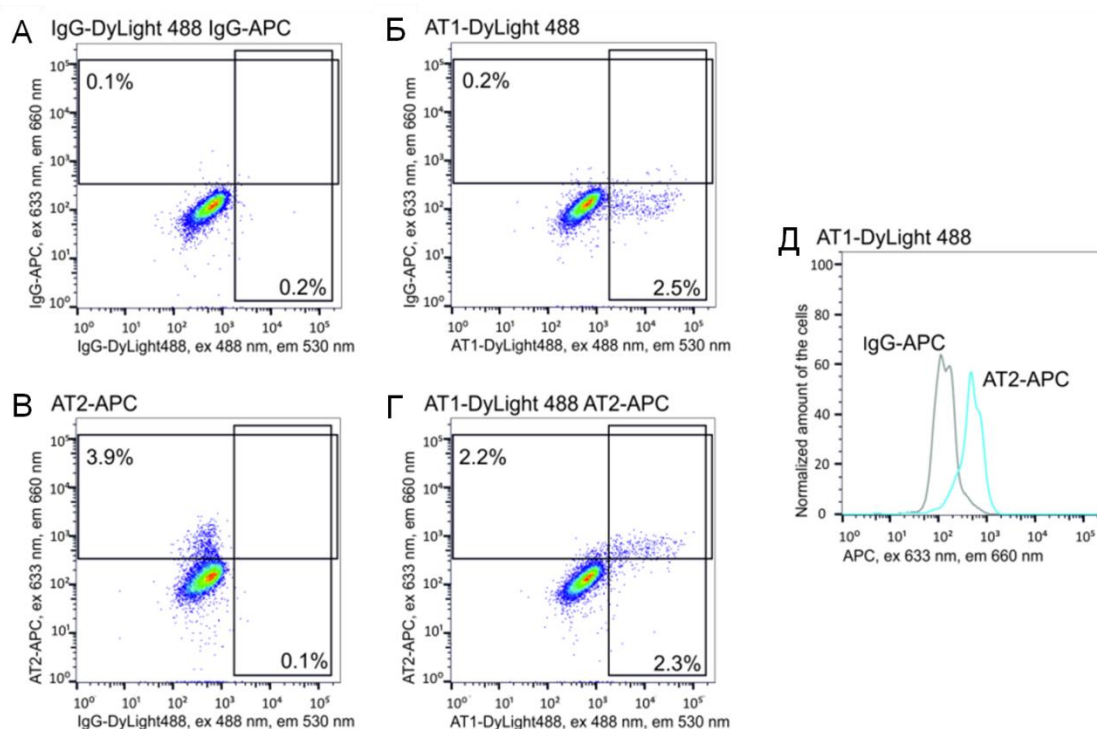


Рисунок 6. АТ1-рецептор не интернализуется на АТ2⁺ МСК. Репрезентативные данные проточной цитофлуориметрии. Окраска при комнатной температуре. А – изотипический контроль IgG-APC, IgG-DyLight 488; Б – окраска АТ1-рецепторов; В – окраска АТ2-рецепторов; Г – двойная окраска АТ1- и АТ2-рецепторов; Д – сравнение одиночной окраски АТ1-рецепторов (серый) и двойной окраски АТ1- и АТ2-рецепторов (голубой), показаны только АТ1⁺-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. Для этого мы выделили субпопуляцию $AT2^+$ помощью клеточного сортера и сравнили с $AT2^-$ МСК. Оказалось, что уровень мРНК ангиотензиногена, ренина, АПФ и ангиотензиназы С, необходимых для синтеза локальных ангиотензиновых пептидов, в этих двух субпопуляциях одинакова (рис. 7 А, В). Кроме того, все МСК: и $AT2^+$, и $AT2^-$, экспрессируют мембранный АПФ (рис. 7 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. 7 Б). То есть практически все МСК ЖТ экспрессируют компоненты локальной РАС, но субпопуляция $AT2^+$ обогащена рецепторами к ангиотензиновым пептидам.

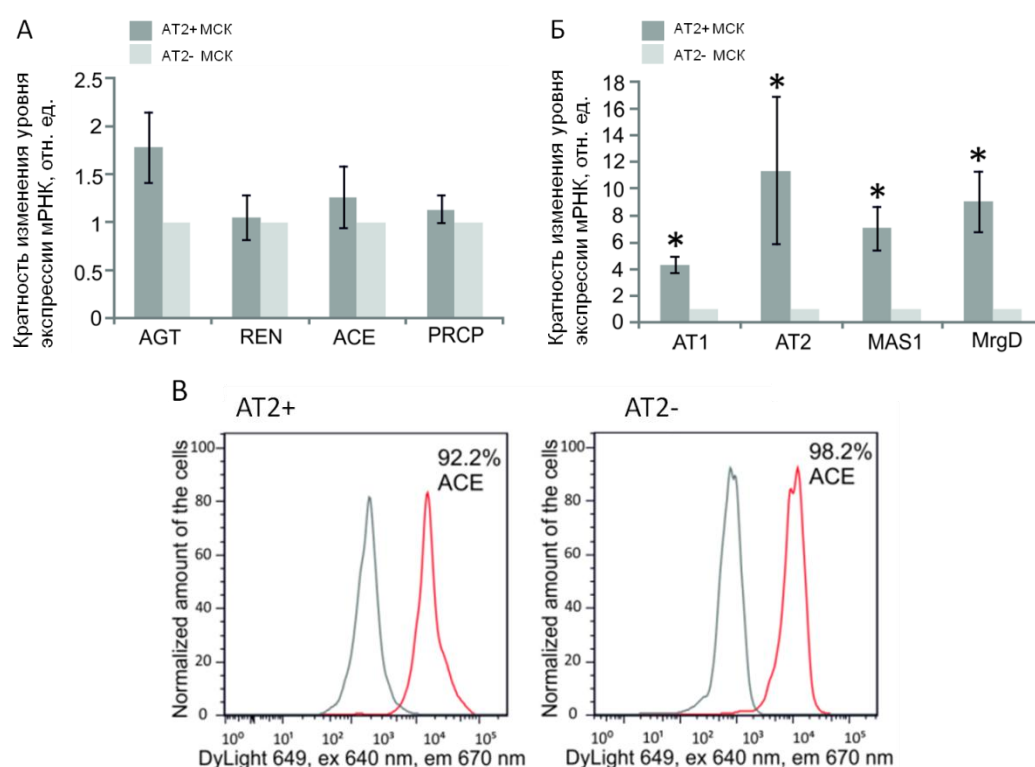


Рисунок 7. Экспрессия компонентов РАС в субпопуляции $AT2^+$ МСК, стабильно экспрессирующих $AT1$ -рецептор. $AT2^+$ – МСК, экспрессирующие $AT2$ -рецептор и стабильно экспрессирующие $AT1$ -рецептор; $AT2^-$ – МСК без $AT2$ -рецептора, в которых $AT1$ -рецептор интернализуется. А – количественный ОТ-ПЦР ангиотензиногена (AGT), ренина (REN), АПФ (ACE), ангиотензиназы 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.

Таким образом, мы впервые показали, что МСК ЖТ гетерогенны по экспрессии компонентов локальной РАС: компоненты, необходимые для синтеза ангиотензиновых пептидов и $AT1$ -рецепторы экспрессируются практически во всех МСК, но есть субпопуляция $AT2^+$ МСК, которая обогащена рецепторами к ангиотензиновым пептидам и содержит не

интернализующиеся AT1-рецепторы. 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.

2. Влияние Ang II на адипогенную дифференцировку МСК ЖТ

Мы провели дифференцировку общей популяции МСК ЖТ в адипоциты в присутствии 0,1 мкМ экзогенного Ang II и показали, что Ang II снижает экспрессию маркеров адипогенеза (CEBP β , PPAR γ и адипонектина, рис. 8).

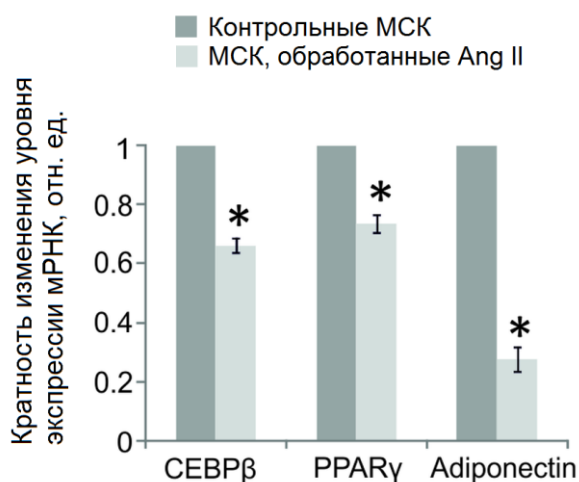


Рисунок 8. Ang II ингибирует адипогенную дифференцировку МСК ЖТ.

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).

То есть экзогенный Ang II ингибирует адипогенную дифференцировку МСК ЖТ, что согласуется с данными большинства ранее опубликованных работ, в которых изучалась дифференцировка преадипоцитов и МСК жировой ткани (Chen et al., 2012; Matsushita et al., 2006). Поэтому мы предположили, что Ang II будет еще сильнее снижать или вообще блокировать адипогенную дифференцировку субпопуляции AT2⁺ МСК, которые обогащены рецепторами к ангиотензиновым пептидам. Чтобы проверить это, мы выделили AT2⁺ МСК методом FACS и индуцировали в них адипогенную дифференцировку без добавления экзогенного Ang II. Но мы обнаружили, что AT2⁺ МСК, напротив, дифференцируются в адипоциты быстрее, чем AT2⁻ МСК: в них достоверно выше экспрессия маркеров адипогенеза (CEBP β , Klf5, PPAR γ и адипонектина) и образуется большее число жировых капель (рис. 9 А, Б). При этом AT2⁺ МСК до индукции дифференцировки экспрессируют адипогенные маркеры (CEBP β , Klf5, PPAR γ) на том же уровне, что и AT2⁻ МСК, то есть они не являются более преддифференцированными в адипогенном направлении (рис. 9 В).

Таким образом, мы идентифицировали в МСК ЖТ 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 и другие компоненты РАС, необходимые для синтеза локального Ang II экспрессируются в них на том же уровне, что и в AT2⁻ МСК (рис. 6 А). Поэтому вероятно, что свойства AT2⁺ МСК отличаются за счет влияния на них локального Ang II.

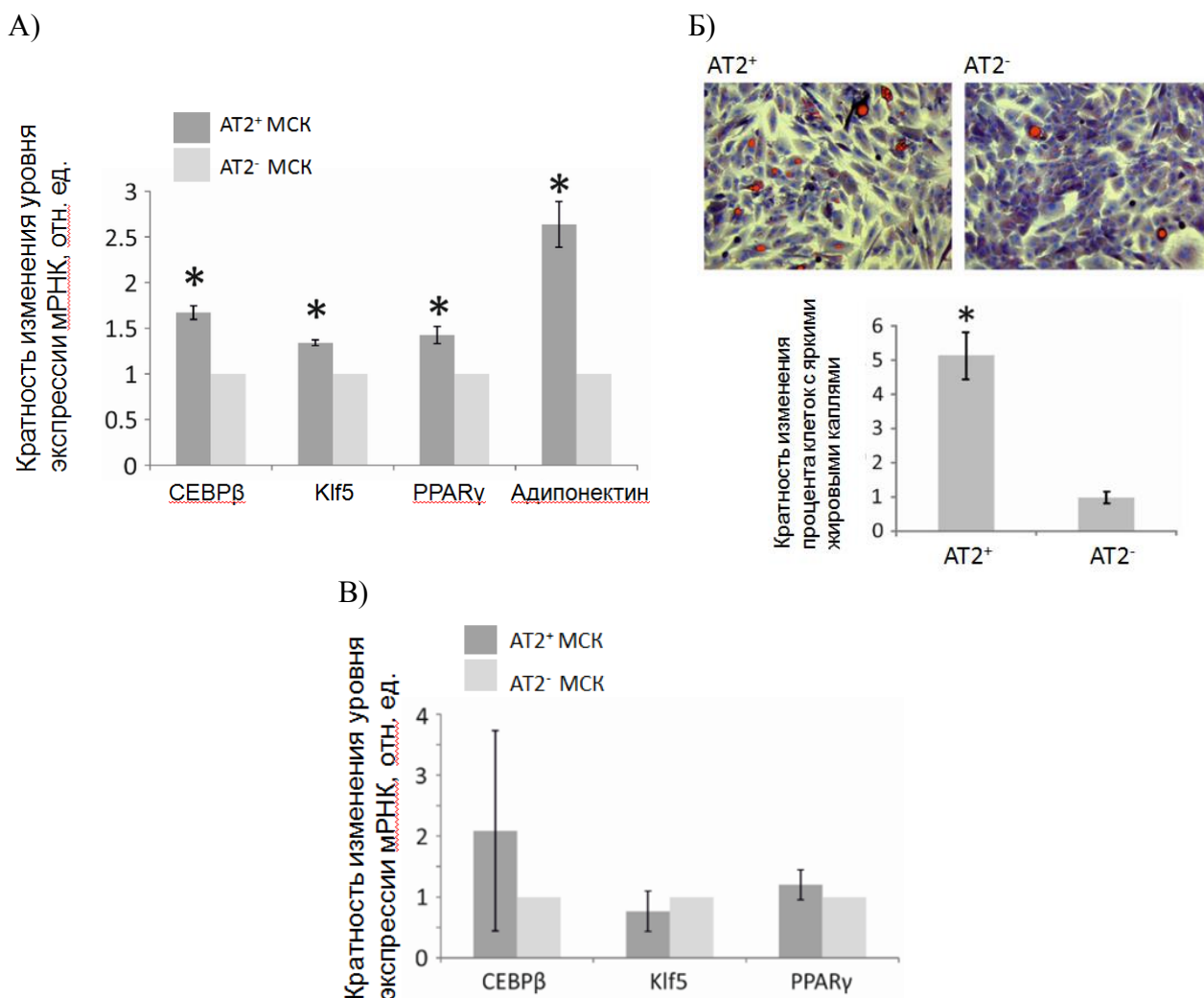
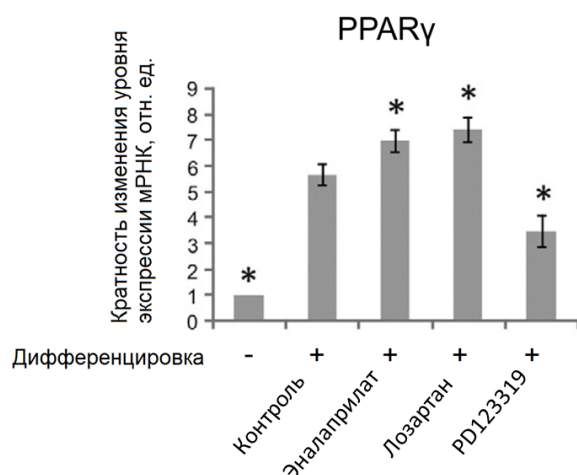


Рисунок 9. AT2⁺ МСК обладают повышенным адипогенным потенциалом. А – количественный ОТ-ПЦР маркеров адипогенеза (CEBPβ, Klf5, PPARγ и адипонектина) мРНК субпопуляции AT2⁺ МСК, дифференцированных в адипоциты. * - $p < 0,05$ по сравнению с AT2⁻ МСК (ранговый дисперсионный анализ по критерию Краскела-Уоллиса 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, PPAR) 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 – PPARγ и адипонектина (рис. 10, эналаприлат и лозартан), а блокирование AT2-рецепторов, наоборот, снижает их экспрессию (рис. 10, PD123319).

А)



Б)

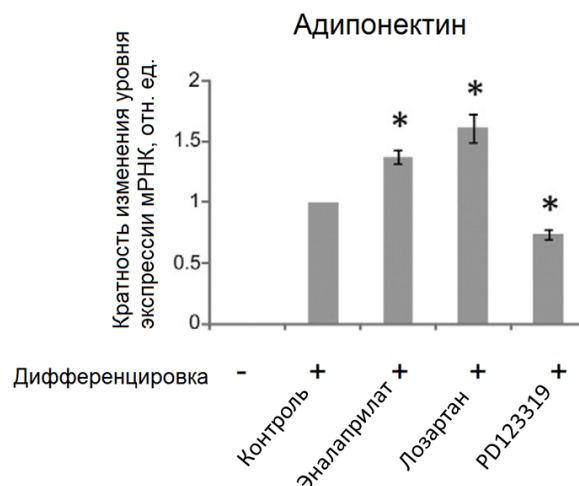


Рисунок 10. Влияние локального Ang II на адипогенную дифференцировку МСК ЖТ. Количественный ОТ-ПЦР мРНК от МСК, дифференцированных в присутствии ингибиторов к АПФ, AT1- и AT2-рецепторам. А – экспрессия PPAR γ , нормализация на недифференцированные МСК, Б – экспрессия адипонектина, нормализация на дифференцированный 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 адипогенез МСК ЖТ и ингибирует его через AT1-рецептор, а активирует через AT2-рецептор. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что AT2⁺ МСК обладают повышенным адипогенным потенциалом за счет влияния на них локального Ang II через AT2-рецептор. Такие отличные от всей остальной популяции МСК функциональные свойства для AT2⁺ МСК также могут быть обусловлены формированием гетеродимеров между AT1- и AT2-рецепторами, в которых AT2-рецептор подавляет функциональную активность AT1-рецепторов (AbdAlla et al., 2001; Yang et al., 2012). Вероятно, именно это приводит к тому, что AT2⁺ МСК в противоположность всей остальной популяции имеют повышенный адипогенный потенциал.

3. Влияние Ang II на секреторную активность МСК ЖТ

Главные процессы, необходимые для возобновления жировой ткани, - это дифференцировка новых адипоцитов, а также поддержание необходимой васкуляризации и иннервации. Мы показали, что Ang II влияет на адипогенную дифференцировку МСК ЖТ – главных предшественников адипоцитов. Процессы же ангиогенеза и регенерации нервов МСК регулируют преимущественно за счет своей секреторной активности. Так было показано, что МСК стимулируют ангиогенез за счет секреции ряда ангиогенных факторов, в том числе VEGF (Rehman et al., 2004), а регенерацию нервов - за счет секреции BDNF (Lopatina et al., 2011). 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 (Liu et al., 2014). Влияние же Ang II на нейротрофические свойства МСК изучено не было. Для определения нейротрофических

свойств МСК мы использовали модель нейритогенеза с клетками мышинной 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.

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. 11). 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 и нейрогенеза: он активирует пролиферацию нейрональных стволовых клеток (Chao et al., 2013), стимулирует нейрогенез в гиппокампе (Koyama et al., 2018), и уменьшает степень повреждений при травмах головного и спинного мозга (Namsolleck et al., 2013; Villapol and Saavedra, 2015). 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.

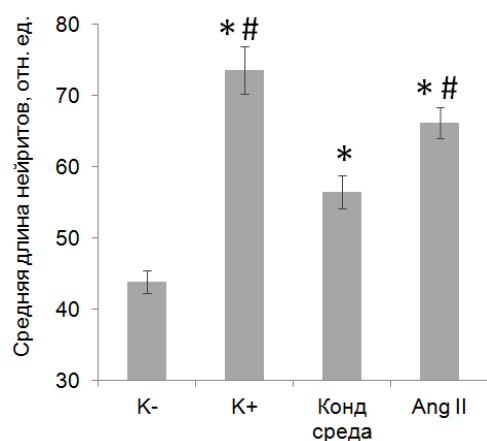
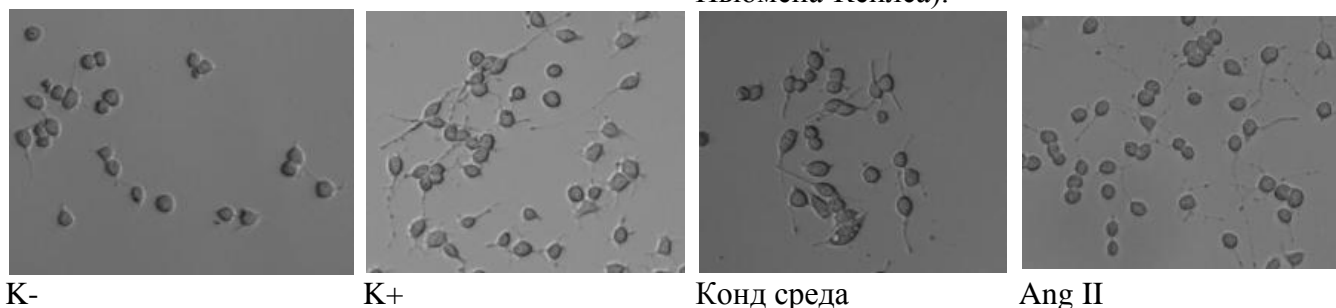


Рисунок 11. Влияние кондиционированной среды МСК на рост нейритов в культуре клеток нейробластомы линии Neuro2A. «K-» - отрицательный контроль, «K+» - положительный контроль (NGF, 50 нг/мл), «Конд среда» - формирование нейритов в присутствии кондиционированной среды МСК, «Ang II» - формирование нейритов 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 уровни мРНК таких факторов через 6 часов после обработки Ang II. 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. 12). Таким образом, Ang II усиливает нейротрофические свойства МСК за счет активации экспрессии в них ряда нейротрофических факторов и факторов роста, стимулирующих нейрорегенерацию. Подобные данные были получены ранее Namsolleck и коллегами (2013) на первичных нейронах: активация AT2-рецептора в их работе индуцировала экспрессию BDNF и других нейротрофических факторов.

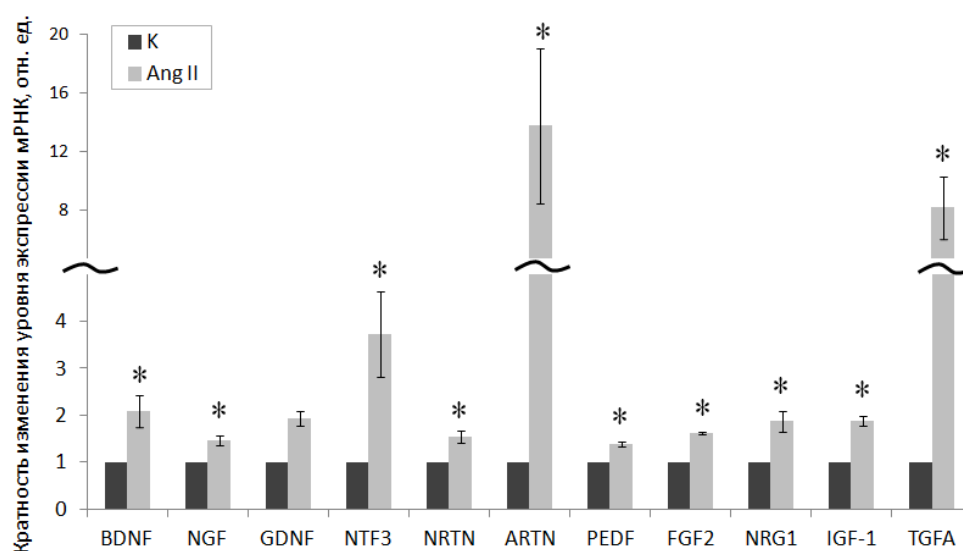


Рисунок 12. Влияние Ang II на экспрессию в МСК мРНК нейротрофических факторов и факторов роста. Содержание мРНК в МСК оценивали с помощью ПЦР «в реальном времени». К – МСК, не обработанные Ang II; Ang II – МСК после обработки Ang II. BDNF – нейротрофический фактор мозга, NGF – фактора роста нервов, GDNF – глиальный нейротрофический фактор, NTF3 – нейротрофин-3, NRTN – нейртурина, 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. Как и в предыдущих экспериментах, предобработка Ang II значительно усиливала способность МСК стимулировать рост нейритов. При этом оказалось, что блокирование AT1-рецептора усиливает эффект Ang II, а блокирование AT2-рецептора, наоборот, полностью подавляет стимулирующий эффект Ang II (рис. 13). То есть Ang II стимулирует

нейротрофические свойства МСК через AT₂-рецептор. Это хорошо согласуется с другими данными литературы о преимущественной роли AT₂-рецептора в регенерации (Chao et al., 2013; Mogi et al., 2013; Namsolleck et al., 2013).

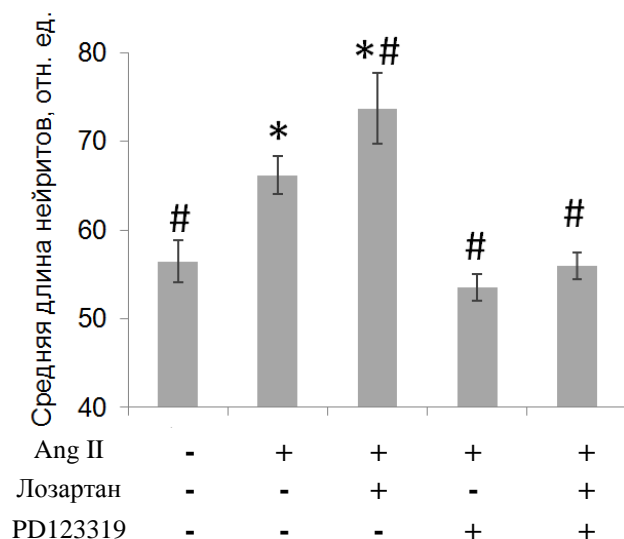


Рисунок 13. Участие ангиотензиновых рецепторов во влиянии Ang II на способность МСК стимулировать рост нейронов у клеток нейробластомы.

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, ангиотенгиназы 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.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, 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).

**ССЫЛКИ НА ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ СОИСКАТЕЛЯ
ПРИВЕДЕНЫ В БАЗАХ ДАННЫХ:**

Web of Science <http://www.researcherid.com/rid/B-2173-2014> (ResearcherID: B-2173-2014)

RSCI https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=726443

Scopus <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=56950865400>

ИСТИНА: <http://istina.msu.ru/profile/AgeevaLV/> (IstinaResearcherID: 8584871)

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (14-15-00439, руководитель Калинина Н.И.; 14-50-00029, руководитель Садовничий В.А.)