

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-3-41-55>



Изменение внутриклеточной сигнализации, индуцированной норадреналином и серотонином, при старении мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека

Е.С. Чечехина¹, К.Ю. Кулебякин^{1,2}, О.А. Григорьева^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2},
П.А. Тюрин-Кузьмин^{1,*}

- ¹ Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр., 27к10
- ² Центр регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр., 27к10

Адрес для корреспонденции: tyurinkuzminpa@my.msu.ru

Аннотация

В данной работе мы исследовали изменения гормональной регуляции стволовых клеток жировой ткани человека при старении и то, как эти изменения ассоциированы с адипогенной дифференцировкой этих клеток. В качестве объекта изучения гормональной регуляции использовали постнатальные стволовые клетки жировой ткани — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК). Мы показали, что как МСК с индуцированным репликативным старением, так и МСК, полученные от пожилых доноров, обладают сниженным адипогенным потенциалом, также у этих клеток нарушены механизмы регуляции адипогенной дифференцировки при действии норадреналина и серотонина. Изучение внутриклеточных сигнальных каскадов позволило установить, что при старении в МСК проявляется пониженная активация как цАМФ-зависимых, так и фосфоинозитид/кальций-зависимых сигнальных каскадов. Кальциевые ответы на стимуляцию норадреналином и серотонином оказались отложенными во времени в МСК с индуцированным репликативным старением. Таким образом, старение приводит к снижению регуляторного воздействия гормонов-регуляторов на адипогенную дифференцировку МСК человека.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, адипогенная дифференцировка, норадреналин, серотонин, внутриклеточная сигнализация, сенесценция, клеточное старение

Конфликт интересов: Ефименко Анастасия Юрьевна является членом редакционной коллегии журнала «Регенерация органов и тканей» с 2023 года, но не имеет отношения к решению о публикации данной статьи. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

Для цитирования: Чечехина Е.С., Кулебякин К.Ю., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А. Изменение внутриклеточной сигнализации, индуцированной норадреналином и серотонином, при старении мультипотентных мезенхимных

стромальных клеток человека. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(3):41–55. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-41-55>

Поступила 06.07.2024

Обработана 16.08.2024

Принята к публикации 10.09.2024

Changes in noradrenaline- and serotonin-dependent intracellular signaling in senescent multipotent mesenchymal stromal cells

Elizaveta S. Chechekhina¹, Konstantin Yu. Kulebyakin^{1,2}, Olga A. Grigorieva^{1,2}, Anastasiya Yu. Efimenko^{1,2}, Pyotr A. Tyurin-Kuzmin¹ *

¹ Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovskiy ave., 27–10

² Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovskiy ave., 27–10

Correspondence address: tyurinkuzminpa@my.msu.ru

Abstract

In this work, we studied how hormonal regulation of human adipose tissue stem cells changes during aging and how changes in hormonal regulation are associated with adipogenic differentiation of these cells. Postnatal adipose tissue stem cells — multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs), were used as an object for studying hormonal regulation. We showed that both MSCs with induced replicative senescence and MSCs obtained from elderly donors have a reduced adipogenic potential. These cells have impaired mechanisms of regulation of adipogenic differentiation under noradrenaline and serotonin. The study of intracellular signaling cascades allowed us to establish that during senescence, MSCs exhibit reduced activation of both cAMP-dependent and phosphoinositide/calcium-dependent signaling cascades. Moreover, calcium responses to the addition of these hormones were delayed in time in MSCs with induced replicative aging. Thus, senescence leads to a decrease in the regulatory effect of hormones on the adipogenic differentiation of human MSCs.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, adipogenic differentiation, noradrenaline, serotonin, intracellular signaling, senescence

Conflict of interest: Efimenko Anastasia Yuryevna has been a member of the editorial board of the journal “Regeneration of organs and tissues” since 2023, but has nothing to do with the decision to publish this article. The article has undergone the peer-review procedure adopted by the journal. The authors have not declared any other conflicts of interest.

Funding: The study was supported by Russian Science Foundation, grant #19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

For citation: Chechekhina E.S., Kulebyakin K.Yu., Grigorieva O.A., Efimenko A.Yu., Tyurin-Kuzmin P.A. Changes in noradrenaline- and serotonin-dependent intracellular signaling in senescent multipotent mesenchymal stromal cells. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(3):41–55. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-41-55>

Received 06.07.2024

Revised 16.08.2024

Accepted 10.09.2024

Список сокращений:

МСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

ІВМХ — изобутиметилксантин

Введение

В последние десятилетия метаболические болезни, ассоциированные с нарушениями функционального состояния жировой ткани, приобрели характер пандемий. Проблема ожирения получила крайне широкое распространение во многих странах мира, в том числе и в России. Ожирение приводит к развитию таких тяжелых и во многих случаях неизлечимых заболеваний, как сахарный диабет 2-го типа и метаболический синдром, серьезных заболеваний дыхательных путей, в том числе бронхиальной астмы, заболеваний органов пищеварения, нарушений половой и репродуктивной функций. Кроме того, при ожирении резко повышается вероятность возникновения некоторых видов раковых заболеваний [1, 2]. Недостаток жировой ткани также ведет к крайне негативным метаболическим последствиям в связи с недостаточной продукцией гормонов жировой ткани — адипокинов и дистрофией висцерального жира и связанными с ней нарушениями в работе внутренних органов.

Поддержание здорового состояния жировой ткани осуществляется за счет баланса между процессами липолиза и липогенеза, а также обновления клеток жировой ткани. Липидный баланс регулируется гормонами и паракринными факторами, действующими на адипоциты. Ключевую роль в поддержании гомеостаза жировой ткани играют резидентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) [3, 4]. С одной стороны, МСК выполняют регуляторную функцию, управляя процессами репарации и регенерации путем паракринной секреции факторов роста, цитокинов и других биологически активных молекул [5, 6]. С другой — МСК под действием специфических стимулов вступают в адипогенную дифференцировку, что приводит к стабильному и медленному обновлению жировой ткани, в процессе которой примерно 10% адипоцитов заменяется на новые каждый год [7].

МСК, являясь важными регуляторами функционирования ткани, сами подвержены строгой нейрогуморальной регуляции. МСК непо-

средственно контактируют с симпатическими нейронами, образуя с ними подобие синапсов, и, располагаясь периваскулярно, воспринимают гормональный фон организма [8]. Таким образом, под управлением гормонов, циркулирующих в крови, и нейромедиаторов симпатической нервной системы МСК осуществляют локальную регуляцию ключевых физиологических функций жировой ткани или сами дифференцируются в компоненты этой ткани.

Гормон и нейромедиатор норадреналин является ключевым регулятором функциональной активности МСК, которые экспрессируют все основные изоформы адренорецепторов, различные субтипы α 1-, α 2- и β -адренорецепторов [9, 10], непосредственно взаимодействуют с симпатическими нейронами и способны отвечать на катехоламины в крови [8]. Норадреналин усиливает расщепление липидов в адипоцитах, подавляет адипогенную дифференцировку МСК, индуцирует превращение белых адипоцитов и МСК в бежевые адипоциты, которые, расщепляя жир, производят в организме тепло [11]. Серотонин в периферических тканях выступает в качестве гормона и паракринного фактора. Большая часть серотонина, синтезируемого вне мозга, производится энтерохромаффинными клетками кишечника и выделяется в кровь. Далее часть серотонина накапливается тромбоцитами в секреторных гранулах, а часть — действует как гормон, регулируя клетки-мишени [12]. Как мы ранее показали, МСК экспрессируют функционально активные рецепторы серотонина, в частности 5-НТ2b, 5-НТ6 и 5-НТ7 [13, 14]. Серотонин действует на функциональную активность МСК схожим с инсулином образом. Серотонин усиливает накопление жировых капель в зрелых адипоцитах, подавляет адипогенную дифференцировку МСК, превращение адипоцитов и МСК в бежевые адипоциты [15]. Таким образом, норадреналин с одной стороны и серотонин с другой являются гормонами-антагонистами на функциональном уровне для МСК. Точный баланс регуляторной активности различных гормонов — регуляторов функциональной активности МСК, а также, что не менее

важно, адекватного реагирования клеток-мишеней на них является залогом здорового функционирования жировой ткани.

Одним из основных факторов, приводящих к нарушению гомеостаза жировой ткани, является клеточное старение, или сенесценция. Под этим термином в первую очередь понимается так называемое «репликативное старение», характеризующееся прогрессирующей утратой клетками способности к делению, а также сопряженное с нарушением основных клеточных функций [16]. Считается, что ведущим процессом, определяющим прогрессию клеточного старения, является остановка деления клеток [17, 18]. В связи с этим именно МСК, обеспечивающие обновление жировой ткани за счет регулярного деления, в первую очередь подвержены старению. Накопление сенесцентных признаков в МСК ведет к значительному нарушению как паракринной активности этих клеток, так и их дифференцировочного потенциала [19]. В нашей лаборатории ранее было показано, что старение МСК может нарушать продукцию ими ангиогенных факторов [20]. Ослабление регуляторной и регенеративной функции МСК приводит к нарушению в функционировании всей ткани и может обуславливать развитие ряда патологий, ассоциированных с возрастом [21].

Материалы и методы

Выделение и культивирование МСК

Образцы подкожной жировой ткани для выделения МСК забирали во время проведения хирургических операций согласно разрешению локального этического комитета МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова (№ 4 от 04.06.2018) при условии подписания пациентом добровольного информированного согласия. Популяцию стволовых клеток жировой ткани МСК мы выделяли из подкожной жировой ткани, взятой из области живота или области бедренного сустава здоровых доноров разного возраста. Образцы забирали в виде биоптата. Критерием исключения служило наличие в анамнезе ожирения, хронических сердечно-сосудистых заболеваний, диабета или инфекционных заболеваний. МСК выделяли согласно ранее описанному протоколу [22, 23]. Кроме того, использовали иммортализованные МСК линии ASC-52Telo (ATCC).

МСК культивировали на чашках Петри для адгезионных культур в полной среде роста (DMEM

с низким содержанием глюкозы 1 г/л («ПанЭко», Россия), 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 1% раствора антибиотика-антимикотика (HyClone, США) в инкубаторе при 37 °C и с 5% CO₂. МСК пассировали с помощью растворов Версена и трипсина («ПанЭко», Россия). Первичную культуру МСК культивировали и использовали в экспериментах в течение 7-го пассажа, за исключением случаев намеренного получения репликативно старых клеток. Часть клеточных культур замораживали для возможности повторной работы с этой же культурой в дальнейшем при необходимости.

Получение сенесцентных МСК

Для получения сенесцентных МСК мы использовали два альтернативных подхода (рис. 1А, В). В одном из них мы забирали жировую ткань от доноров разного возраста: в первую группу входили доноры в возрасте 20–40 лет, во вторую группу — доноры старше 70 лет в другом — мы культивировали клетки в течение продолжительного времени (до 10–12 пассажей).

Адипогенная дифференцировка МСК

Для оценки клеточных эффектов гормонов — регуляторов адипогенной дифференцировки мы регистрировали процесс дифференцировки в динамике. Адипогенную дифференцировку индуцировали при помощи дифференцировочной смеси, состоящей из инсулина (10 нг/мл, Sigma, США), ингибитора фосфодиэстеразы изобутиметилксантина (IBMX, 0,5 мМ, Abcam, США) и глюкокортикоида дексаметазона (1 мкМ, Sigma, США), добавленных в полную среду роста (см. раздел «Выделение и культивирование МСК»). На протяжении дифференцировки дифференцировочную среду обновляли каждые 3–4 дня, в ней содержались все компоненты дифференцировочного коктейля. Норадреналином и серотонином мы обрабатывали клетки в течение 1 часа перед запуском адипогенной дифференцировки, после чего клетки отмывались от гормонов. Сама дифференцировка проходила в отсутствие действующих норадреналина и серотонина. Жировые капли хорошо видны в проходящем свете при использовании фазово-контрастной микроскопии. Благодаря этому процесс дифференцировки можно наблюдать под микроскопом без дополнительной окраски клеточных структур. В то же время мы подтвердили, что капли, наблюдаемые нами, действительно являются жировыми

каплями в цитоплазме. Для этого мы дополнительно окрашивали их при помощи специфического красителя нейтральных жиров OilRed O (данные не приведены). Долю дифференцированных клеток считали как отношение числа клеток, содержащих жировые капли, в поле зрения микроскопа, к общему числу клеток в данном поле зрения. Для статистической обработки брали не менее 3 полей зрения в каждом эксперименте. На протяжении разных дней наблюдения использовали для подсчета случайные поля зрения.

Определение уровня цАМФ при помощи иммуноферментного анализа

Для определения уровня цАМФ мы проводили иммунофлуоресцентный анализ с помощью *cAMP Direct Immunoassay Kit (ab138880)* по протоколу производителя. За сутки до эксперимента клетки рассаживали с плотностью 3×10^4 – 10^6 на лунку в 96-луночный планшет. Используя 100 мкМ *cAMP standards*, разводили стандарты в различных концентрациях для построения калибровочной прямой. Проводили полную аспирацию среды роста в чашках. Добавляли 100 мкл *Cell lysis buffer* на лунку. Оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Центрифугировали в течение 5 минут при 4 °C на высокой скорости для удаления нерастворимого материала. Собирали и перемещали в новую пробирку, после чего убирали на лед. Затем добавляли пробы и стандарты в 96-луночный планшет, после чего оставляли на 5–10 минут при комнатной температуре. Готовили раствор цАМФ, конъюгированного с пероксидазой хрена, $1 \times$ *HRP-cAMP working solution* путем разбавления $50 \times$ стокового *HRP-cAMP раствора в Assay buffer*. Перемешивали и оставляли на льду. Добавляли 25 мкл приготовленного раствора в каждую лунку. Инкубировали течение 2-х часов при комнатной температуре на шейкере. Аспирировали содержимое лунок. Далее промывали 4 раза $1 \times$ раствором для промывки (*Wash solution*) 200 мкл на лунку. Подготавливали раствор красителя *AbRed working solution* путем разбавления 50 мкл $200 \times$ *AbRed stock solution* и 11,5 мкл пероксида водорода в 10 мл *Substrate Buffer*. Добавляли 100 мкл *AbRed working solution* в каждую лунку. Инкубировали при комнатной температуре 10 минут в темном месте. Измеряли флуоресценцию ($E_{x/E_{m}} = 540/590$ nm) и визуализировали результаты с помощью планшетного ридера с флуоресцентным модулем PerkinElmer EnVision (США).

Регистрация активности протеинкиназы А на уровне единичных клеток при помощи генетически кодируемого биосенсора PKA-SPARK

Для регистрации активации протеинкиназы А с помощью биосенсора PKA-Spark мы использовали трансдуцированные биосенсором иммортализованные МСК, описанные нами ранее [24]. Используемая культура клеток была получена на основе коммерчески доступной линии иммортализованных МСК человека ASC52-telo. Эти клетки постоянно экспрессируют биосенсор в результате лентивирусной трансдукции. Клетки высаживали в 24- или 48-луночных планшетах при низкой плотности, чтобы предотвратить межклеточные коммуникации во время визуализации сигнала. Перед началом эксперимента ростовую среду меняли на сбалансированный солевой раствор Хенкса («ПанЭко», Россия) с 20 мМ ХЕПЕС (HyClone, Logan, UT, США). Для анализа функциональной активности на клетки воздействовали 1 мМ норадреналина (Abcam, США), 10 мМ серотонина (Abcam, США), 1 мМ активатора аденилатциклаза форсколина (Abcam, США) или 100 мМ прямого активатора протеинкиназы А 6-Bnz-cAMP (Biolog, Германия). Активацию протеинкиназы А измеряли в отдельных клетках с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon, Япония) и цифровой охлаждаемой монохромной CCD-камерой Nikon DS-Qi1 (Nikon, Япония). Для увеличения количества анализируемых клеток использовали одновременное измерение 6×6 полей зрения в режиме Large Image. Видеозаписи анализировали с помощью программ NIS-Elements (Nikon) и ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США). В связи с тем что для регистрации активации протеинкиназы А необходимо, чтобы биосенсор PKA-Spark экспрессировался в клетках на высоком уровне [24], в данном эксперименте анализировали только МСК, экспрессирующие PKA-Spark на уровне, превышающем установленный порог. Сигнал PKA-Spark рассчитывали как сумму площадей всех флуоресцентных капель после вычитания фона с помощью инструмента «Rolling-ball» (программа ImageJ, Bethesda, MD, США).

Регистрация внутриклеточной кальциевой сигнализации на уровне одиночных клеток

Кальциевые ответы МСК на гормоны регистрировали на уровне одиночных клеток. За 1 день до эксперимента клетки высаживали на 48-луночный планшет в плотности 15–30% от монослоя. Такая плотность посадки обусловлена

необходимостью анализа чувствительности к норадреналину отдельных клеток. В монослое МСК образуют щелевые контакты, что способствует перетеканию ионов и вторичных посредников и распространению воспринимаемого сигнала на соседние клетки [25, 26]. Клеточные ответы МСК на норадреналин и серотонин определяли по изменению концентрации кальция в клетках. Для этого клетки окрашивали с помощью проникающего через мембрану красителя Fluo-8 AM, который после отщепления ацетометильных групп становится чувствительным к изменениям внутриклеточного уровня кальция (Abcam, Великобритания, ab142773). Чтобы снизить уровень аутофлуоресценции среды, перед окрашиванием клетки промывали 3 раза с помощью 0,3 мл раствора Хэнкса. Затем добавляли Fluo-8 AM в концентрации 4×10^{-6} моль/л в растворе Хэнкса с 20 мМ ХЕПЕС. Клетки окрашивали в течение 1 часа в инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DLL 10X/0.3 (Nikon, Япония) и sCMOS камерой Photometrics Kinetix (Teledyne Photometrics, США). Для регистрации кальциевых ответов на добавление норадреналина на уровне одиночных клеток сначала записывали базальную активность клеток в течение 5–10 минут. Затем, не останавливая записи фильма, прямо под микроскопом добавляли к клеткам раствор гормона в 2-кратной концентрации и в объеме, равном объему среды над клетками, для эффективного перемешивания сред. Далее записывали фильм в течение необходимого времени (обычно дополнительно 10–15 мин). Изменение концентрации внутриклеточного кальция детектировали индивидуально в каждой клетке по изменению интенсивности флуоресценции Fluo-8 относительно состояния той же клетки перед добавлением гормона с помощью программного обеспечения NIS-Elements (Nikon, Япония).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., США). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро — Уилка. Результаты представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Для сравнения нормально распределенных данных использовали *t*-критерий Стьюдента для двух

независимых групп. Для ненормально распределенных данных использовали тест Манна — Уитни для двух независимых групп. Сравнение трех и более независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Чтобы определить, какие именно пары средних значений статистически значимо различаются, использовали тест Даннета. Статистическую значимость определяли как значение $p < 0,05^*$.

Результаты и их обсуждение

В данной работе мы исследовали, как изменяется гормональная регуляция стволовых клеток жировой ткани человека при старении и как эти изменения ассоциированы с адипогенной дифференцировкой МСК. При старении, согласно литературным данным, меняется морфология МСК, происходят хромосомные aberrации и индуцируется клеточное старение [27, 28]. Как видно на рисунке 1Г, Д, клетки, полученные от пожилого донора, имеют сильно измененную морфологию. Они оказываются существенно более распластанными, в цитоплазме появляются высококонтрастные включения, клетки медленнее растут и у них в большей степени развито контактное торможение, о чем свидетельствует то, что клетки не наползают друг на друга, а равномерно заполняют свободное пространство. В то же время известно, что способность к формированию клеточных пластов является важной чертой, характерной для МСК, которая в настоящее время используется в некоторых подходах регенеративной медицины [29]. Таким образом, МСК при старении изменяют как морфологию, так и функциональный фенотип.

Адипогенная дифференцировка МСК

На рисунке 2 показана скорость адипогенной дифференцировки МСК, оцененная по появлению клеток с липидными включениями в цитоплазме. Как видно на рисунке 2А, старение клеток, как хронологическое, так и репликативное, снижает эффективность и скорость адипогенной дифференцировки. На рисунках 2Б–Г показано влияние старения клеток на регуляторное воздействие норадреналина и серотонина на адипогенную дифференцировку МСК. Видно, что не только снижается эффективность дифференцировки нестимулированных клеток, но и пропадает регуляторное воздействие этих гормонов. При этом выявляется заметная гетерогенность функциональных свойств МСК, выделенных от разных доноров. В связи с этим

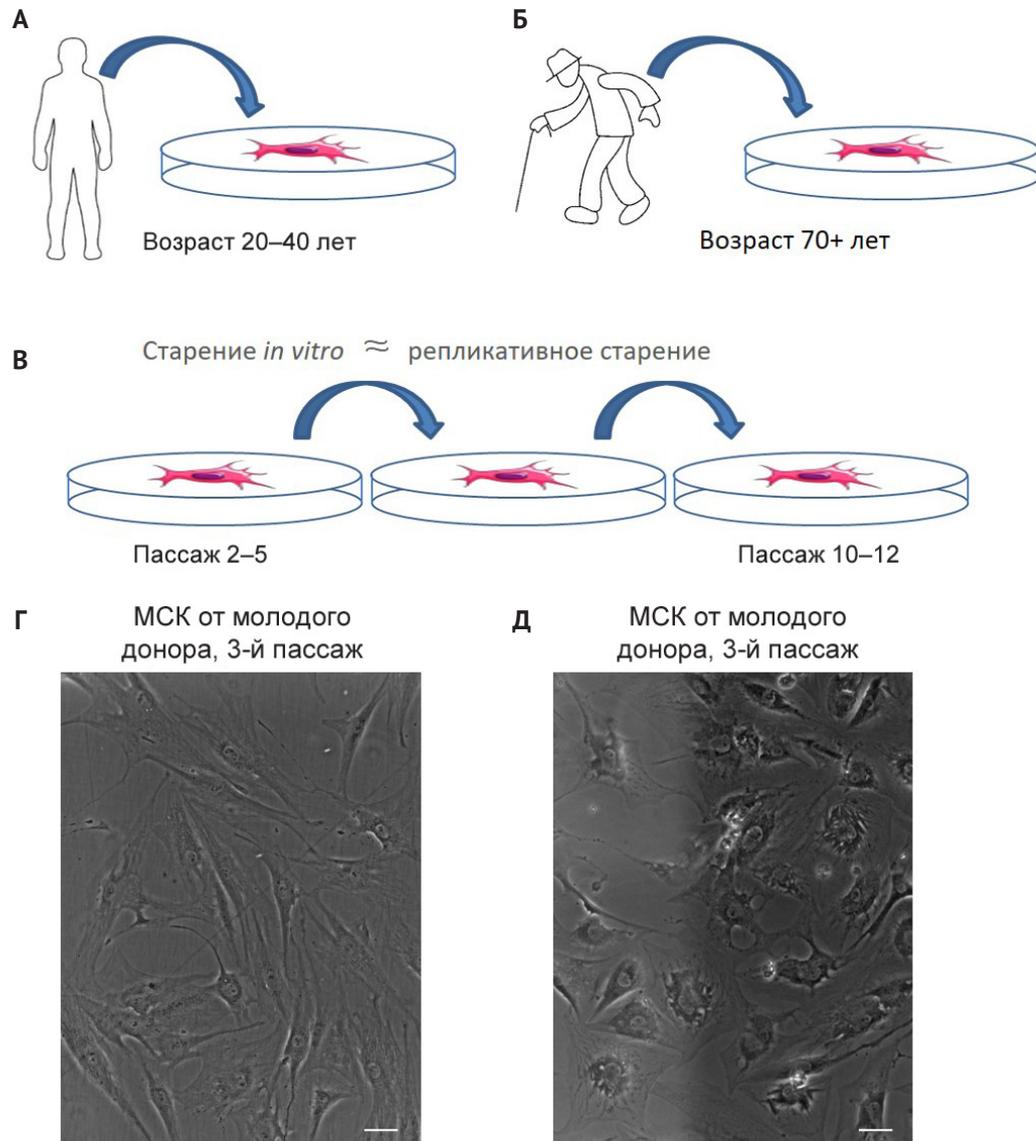


Рис. 1. А-В. Описание методик получения клеток, ассоциируемых с молодыми и «старыми» МСК: А – молодые МСК выделяли из жировой ткани пациентов 20–40 лет без хронических заболеваний; Б – МСК пожилых доноров выделяли из жировой ткани пациентов старше 70 лет; В – дополнительно использовали модель репликативного старения, при которой клетки культивировали до 10–12 пассажей; Г–Д: микрофотографии МСК 3-го пассажа, полученных от молодого (Г) и пожилого (Д) доноров, в проходящем свете (масштабный отрезок 20 мкм)

Fig. 1. A-B. Description of the methods for obtaining cells associated with young and senescent MSCs: A – young MSCs were isolated from the adipose tissue of patients 20–40 years old without chronic diseases; Б – MSCs from elderly donors were isolated from the adipose tissue of patients over 70 years old; В – A replicative aging model was additionally used, in which the cells were cultured for up to 10–12 passages. Г–Д. Microphotographs of passage 3 MSCs obtained from young (Г) and elderly (Д) donors in phase contrast (scale bar 20 μm)

при усреднении абсолютных значений числа дифференцированных клеток в поле зрения микроскопа возникает очень большая вариабельность результатов. В МСК ранних пассажей, полученных от молодых доноров, серотонин и норадреналин оказывают заметное и закономерное влияние на адипогенную дифферен-

цировку: норадреналин подавляет ее, а серотонин — усиливает. В то же время в состарившихся клетках, как полученных путем репликативного старения, так и в клетках, полученных от пожилых доноров, регуляторное действие норадреналина и серотонина либо пропадает, либо становится неоднозначным и непредсказуемым.

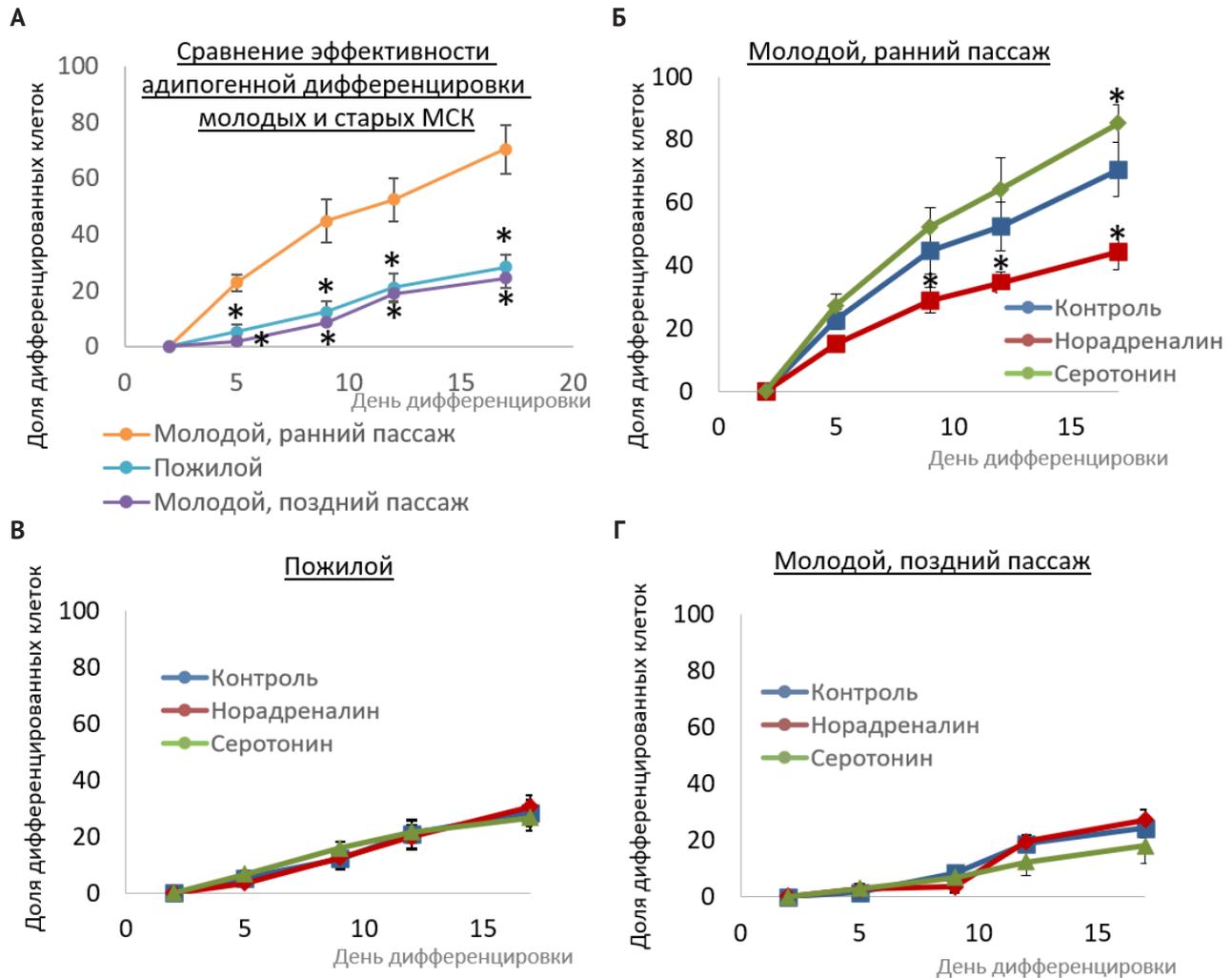


Рис. 2. Влияние норадреналина и серотонина на динамику адипогенной дифференцировки МСК: А – динамика адипогенной дифференцировки в контрольных условиях МСК, полученных от молодых пациентов, на ранних пассажах (оранжевая кривая, «Молодой, ранний пассаж»), МСК, полученных от пожилых пациентов, (голубая кривая, «Пожилой») и МСК, полученных от молодых пациентов, на поздних пассажах (фиолетовая кривая, «Молодой, поздний пассаж»); Б – динамика адипогенной дифференцировки МСК, полученных от молодых пациентов, в контрольных условиях (синяя кривая), после обработки 1 μM норадреналина (бордовая кривая) или 10 μM серотонина (зеленая кривая); В – динамика адипогенной дифференцировки МСК, полученных от молодых пациентов, репликативно состаренных (поздний пассаж). Концентрации добавленных гормонов и цветовая кодировка графиков те же; Г – динамика адипогенной дифференцировки МСК, полученных от пожилых пациентов. Концентрации добавленных гормонов и цветовая кодировка графиков те же. Данные представлены как среднее \pm ст. ош., $n = 4-9$, * $p < 0,05$ относительно молодых МСК в А и относительно контрольных условий в Б. Сравнение трех независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста Даннета. Для получения результатов в каждой группе использовали МСК, выделенные от 2–4 различных доноров

Fig. 2. Effect of noradrenaline and serotonin on the dynamics of adipogenic differentiation of MSCs: A – dynamics of adipogenic differentiation in control conditions of MSCs obtained from young patients at early passages (orange curve, «Young, early passage»), MSCs obtained from elderly patients (blue curve, «Elderly») and MSCs obtained from young patients at late passages (purple curve, «Young, late passage»); Б – dynamics of adipogenic differentiation of MSCs obtained from young patients under control conditions (blue curve), after treatment with 1 μM noradrenaline (burgundy curve) or 10 μM serotonin (green curve); В – dynamics of adipogenic differentiation of MSCs obtained from young patients, replicatively aged (late passage). The concentrations of added hormones and the color coding of the graphs were the same; Г – the dynamics of adipogenic differentiation of MSCs obtained from elderly patients. The concentrations of added hormones and the color coding of the graphs were the same. Data are presented as mean \pm standard deviation, $n = 4-9$, * $p < 0.05$ relative to young MSCs in A and relative to control conditions in Б. Comparison of three independent groups was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. To obtain the results, MSCs isolated from 2–4 different donors were used in each group

Измерение сигнализации в МСК

Для выяснения того, какие из сигнальных каскадов, активируемых гормонами — модуляторами адипогенной дифференцировки МСК, норадреналином и серотонином, изменяются при клеточном старении, мы проанализировали ключевые сигнальные каскады, запускаемые рецепторами этих гормонов. Различные изоформы семидоменных рецепторов норадреналина и серотонина могут быть ассоциированы с сигнальными каскадами, приводящими либо к увеличению уровня внутриклеточного кальция, либо к изменению уровня внутриклеточного цАМФ. МСК представляют собой гетерогенную популяцию клеток [30]. Как мы ранее установили на примере норадреналина, не все клетки в популяции МСК единообразно отвечают на действие этого гормона. Несмотря на то что адренергические рецепторы экспрессируются практически на всех отдельных клетках популяции МСК, функционально активными оказываются рецепторы лишь в 7% клеток [9, 10]. Клетки, не отвечающие на норадреналин, тем не менее способны отвечать на другие гормоны [13]. В связи с этим измерение сигнальных процессов в МСК крайне желательно производить на уровне отдельных клеток.

цАМФ-зависимая сигнализация

Бета-адренорецепторы, а также 4, 6 и 7-я изоформы серотониновых рецепторов (HTR4, HTR6, HTR7) ассоциированы с тримерным Gs-белком, который активирует аденилатциклазу и синтез цАМФ. Одной из ключевых сигнальных мишеней цАМФ является протеинкиназа А. Активность этого сигнального каскада в данной работе мы регистрировали на двух уровнях. Во-первых, при помощи иммуоферментного анализа мы определили, как изменяется уровень цАМФ после стимуляции клеток гормонами серотонином и норадреналином. Мы выяснили, что в МСК, полученных от молодых доноров, на ранних пассажах в ответ на норадреналин и серотонин повышается внутриклеточный уровень цАМФ (рис. 3). При этом в клетках, подверженных клеточному старению, как репликативному, так и хронологическому, повышения цАМФ не происходит. Более того, в клетках, полученных от пожилых доноров, наблюдается тенденция к снижению уровня цАМФ, что может свидетельствовать о преимущественной активации альфа2-адренорецепторов, ассоциированных с Gi-тримерным белком, подавляющим активацию аденилатциклазы. Таким образом, при клеточном старении возникают нарушения активации

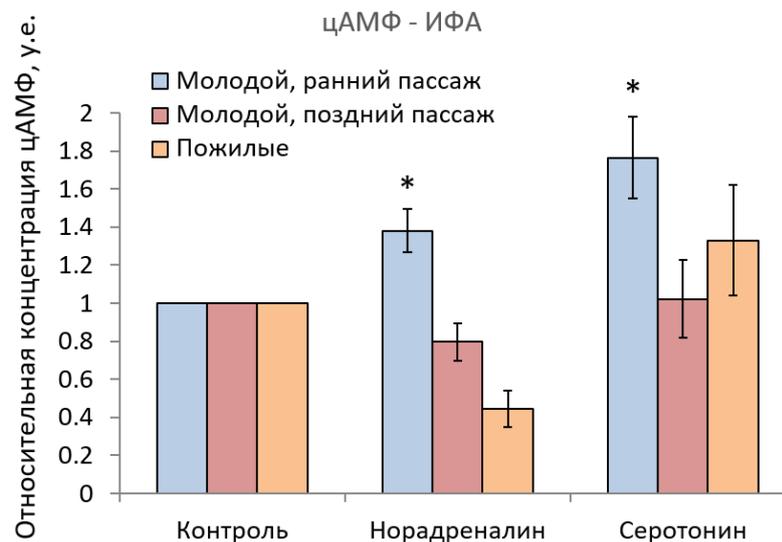


Рис. 3. Измерение уровня цАМФ в молодых и старых МСК после воздействия норадреналина и серотонина. Данные нормированы на значения цАМФ, определенные для того же донора в контрольных условиях. $N = 3$, среднее \pm ст. ош., * $p < 0,05$. Сравнение трех независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста Даннета. Для получения результатов в каждой группе использовали МСК, выделенные от 2 различных доноров

Fig. 3. Measurement of cAMP levels in young and senescent MSCs after exposure to noradrenaline and serotonin. Data were normalized to cAMP values measured for the same donor under control conditions. $N = 3$, mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$. Three independent groups were compared using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. MSCs isolated from 2 different donors were used in each group to obtain results

аденилатциклазной системы в ответ на действие как серотонина, так и норадреналина.

Наблюдаемые нарушения цАМФ-зависимой сигнализации могут быть следствием изменения паттерна экспрессии рецепторов к изучаемым гормонам, или же может происходить нарушение передачи внутриклеточного сигнала. Для проверки второй гипотезы мы регистрировали активацию протеинкиназы А в ответ на действие норадреналина и серотонина

на уровне одиночных клеток. Для этого мы использовали флуоресцентный генетически кодируемый биосенсор PKA-Spark, который чувствителен к активации протеинкиназы А. Биосенсор PKA-Spark содержит в своем составе пептидную последовательность, которую специфически фосфорилирует протеинкиназа А. При фосфорилировании молекулы биосенсора подвергаются олигомеризации, сигнал флуоресцентного белка обратимо меняет локализацию в цитоплазме, собираясь в агрегаты,

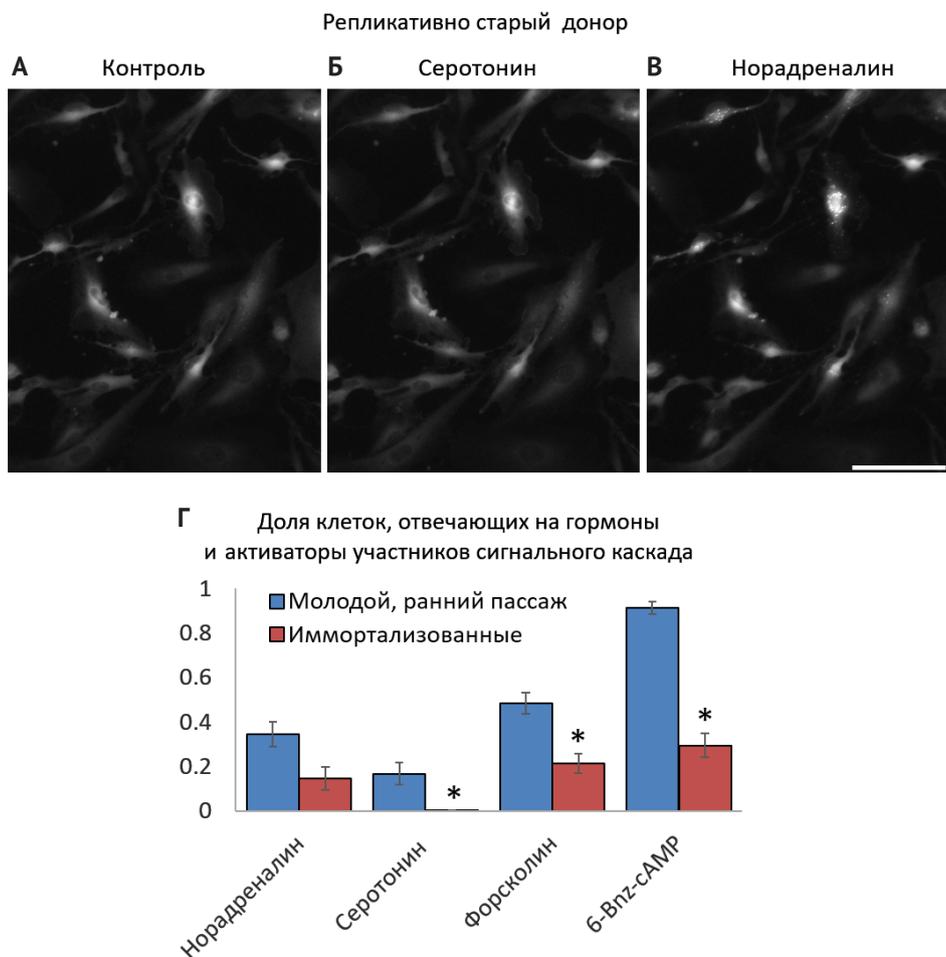


Рис. 4. Регистрация активации протеинкиназы А в МСК жировой ткани человека с помощью биосенсора PKA-Spark: А–В. Репрезентативные изображения клеток иммортализованных МСК линии ASC52-telo в контрольных условиях (А) и в ответ на добавление серотонина (Б) и норадреналина (В). Клетки последовательно были простимулированы сначала серотонином, потом норадреналином. Г – статистическая обработка результатов измерения активации протеинкиназы А в ответ на действие норадреналина, серотонина, активатора аденилатциклаза форсколина (1 μM) и прямого активатора протеинкиназы А 6-Bnz-cAMP (100 μM). $N = 3$, среднее \pm ст. ош. ср., * $p < 0,05$. Для сравнения двух групп с ненормально распределенными данными использовали тест Манна – Уитни для двух независимых групп

Fig. 4. Registration of protein kinase A activation in human adipose-derived MSCs using the PKA-Spark biosensor: A–B. Representative images of immortalized ASC52-telo MSC cells under control conditions (A) and in response to the addition of serotonin (B) and noradrenaline (B). The cells were sequentially stimulated with serotonin and noradrenaline. Г – statistical analysis of the results of measuring protein kinase A activation in response to noradrenaline, serotonin, the adenylate cyclase activator forskolin (1 μM), and the direct activator of protein kinase A 6-Bnz-cAMP (100 μM). $N = 3$, mean \pm SEM, * $p < 0.05$. The Mann–Whitney test for two independent groups was used to compare two groups with non-normally distributed data

тем самым позволяя наблюдать за активацией протеинкиназы А [31].

Мы определили функциональную гетерогенность цАМФ-зависимых ответов МСК, полученных от молодых доноров, и клеток с индуцированным репликативным старением. МСК, полученные от пожилых пациентов, подвергались вирусной трансдукции существенно хуже, чем молодые МСК. Кроме того, попытка получения репликативно старых МСК из клеток, в которых был экспрессирован биосенсор, также не увенчалось успехом, поскольку экспрессия биосенсора подавлялась в МСК по мере их культивирования. В качестве компромиссной модели клеток с репликативным старением мы взяли иммортализованные МСК, которые, как мы ранее описали, по ряду направлений проявляют признаки репликативного старения, несмотря на экспрессию в них теломеразы [32, 33].

Как показано на рисунке 4, молодые МСК отвечают повышением внутриклеточного уровня кальция и на норадреналин, и на серотонин. Доля клеток популяции, отвечающих на норадреналин, в репликативно старых клетках более чем в два раза ниже, чем в молодых МСК. Более того, на серотонин репликативно старые клетки не отвечают вовсе. Как мы ранее показали, в популяции МСК присутствует гетерогенность по чувствительности к цАМФ-зависимым гормонам, связанная с различной экспрессией аденилатциклазы [24]. Более чем в половине клеток популяции не экспрессируется ни одна из 10 изоформ аденилатциклазы [24]. Такие клетки не демонстрировали ответ на активатор аденилатциклазы форсколин, но отвечали на прямой активатор протеинкиназы А негидролизующий аналог цАМФ 6-Bnz-cAMP. По сравнению с МСК ранних пассажей репликативно старые МСК проявляли существенно более слабый ответ на форсколин и, что более важно, показывали небольшое число клеток, отвечающих на 6-Bnz-cAMP. Это, по-видимому, означает, что большая часть репликативно старых клеток лишена не только функциональной аденилатциклазы, но еще и протеинкиназы А.

Кальциевая сигнализация

Помимо цАМФ-зависимых сигнальных каскадов, норадреналин и серотонин активируют также кальциевую сигнализацию. Альфа1-адренорецепторы и серотониновые 5HT₂ рецепторы, экспрессирующиеся в МСК, ассоциированы

с G_q-тримерным белком, который запускает фосфоинозитидный обмен, синтез IP₃ и выход кальция из внутриклеточных депо [10, 34]. Кроме того, Gi-ассоциированные семидоменные рецепторы могут активировать кальциевую сигнализацию посредством активации βγ-субъединиц (при этом запускается как выход кальция из внутриклеточных депо при активации фосфолипазы C, так и вход кальция извне за счет βγ-зависимой активации кальциевых каналов плазматической мембраны).

Изменение внутриклеточного уровня кальция мы регистрировали с помощью флуоресцентного кальциевого зонда Fluo8. Как показано на рисунке 5А, не все клетки отвечали на норадреналин кальциевой сигнализацией. Доля функционально активных клеток составляла порядка 40%. При этом если на поздних пассажах МСК молодых доноров чувствительность к норадреналину существенно не изменялась, то в клетках, полученных от пожилых доноров, она имела тенденцию к снижению. Рисунок 5В показывает кальций-зависимые ответы МСК на добавление серотонина. Как видно, при индукции старения клеток происходит снижение доли клеток, отвечающих изменением внутриклеточной концентрации кальция на действие серотонина.

Стоит отметить, что при репликативном старении клеток увеличивалось время, проходящее от момента добавления гормона до развития кальциевого ответа (рис. 5В, Г). В клетках, полученных от пожилых доноров, время развития кальциевого сигнала после добавления как норадреналина, так и серотонина не увеличивалось, но проявлялась тенденция к возрастанию продолжительности кальциевого сигнала. Увеличение продолжительности кальциевого сигнала может быть связано с нарушением механизмов терминации кальциевого сигнала, например десенситизации рецептора.

Таким образом, при старении МСК снижается чувствительность клеток к норадреналину и серотонину при проведении сигнала как цАМФ-зависимыми сигнальными путями, так и Ca²⁺-зависимыми. Установленные изменения в механизмах гормональной регуляции МСК в процессе клеточного старения могут обуславливать нарушения функционирования всей жировой ткани, что, в свою очередь, может приводить к ожирению или к дистрофии жировой ткани.

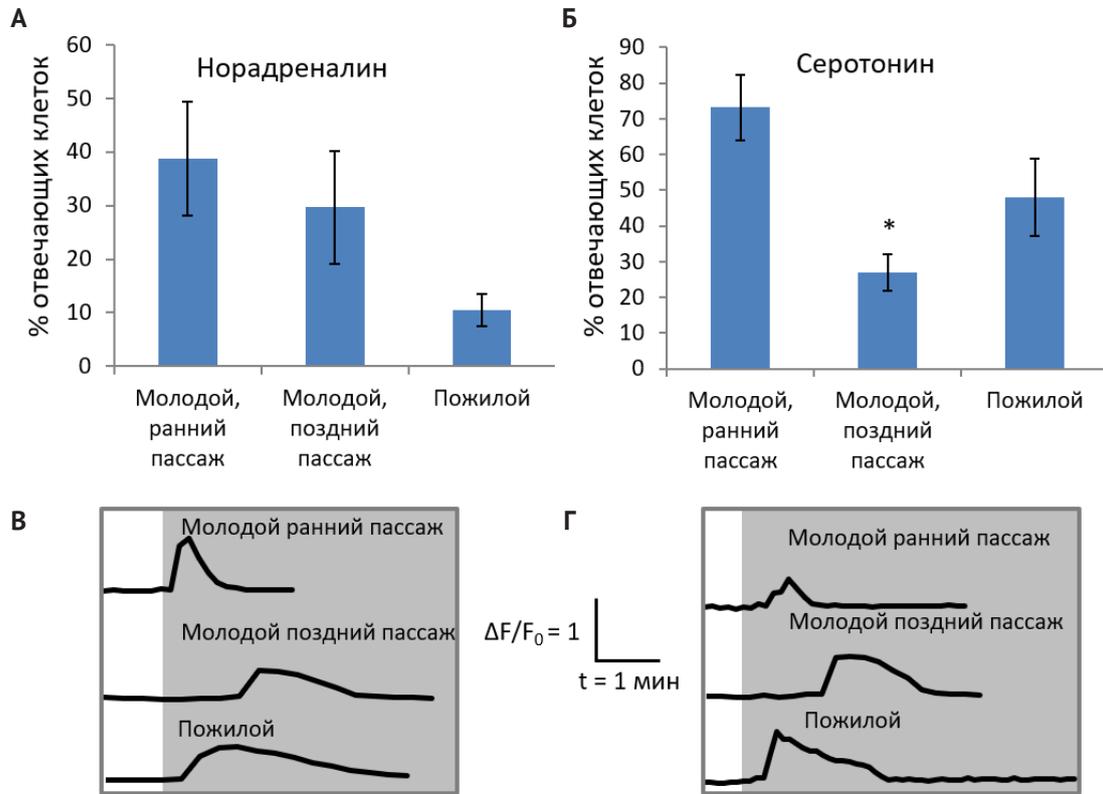


Рис. 5. Кальциевая сигнализация в МСК в ответ на действие норадреналина и серотонина: А – доля клеток молодых на раннем пассаже, молодых на поздних пассажах (репликативно старых), МСК, выделенных из жировой ткани пожилых пациентов, отвечающих на норадреналин; Б – доля клеток молодых на раннем пассаже, молодых на поздних пассажах (репликативно старых), МСК, выделенных из жировой ткани пожилых пациентов, отвечающих на серотонин. $N = 12-19$, среднее \pm ст. ош. ср., * $p < 0,05$. Сравнение трех независимых групп выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста Даннета. Для получения результатов в каждой группе использовали МСК, выделенные из 2 различных доноров; В – репрезентативные кальциевые ответы молодых и старых одиночных МСК на норадреналин; Г – репрезентативные кальциевые ответы молодых и старых МСК на серотонин. Серым цветом отмечены периоды времени, когда клетки находились в окружении добавленного гормона. Обозначение шкал и масштабных отрезков для рисунков (В) и (Г) единое и приведено посередине между панелями рисунков

Fig. 5. Calcium signaling in MSCs in response to noradrenaline and serotonin: A – proportion of MSCs isolated from young donors at early passages, MSCs isolated from young donors at late passages (replicatively old), MSCs isolated from adipose tissue of elderly patients, responding to norepinephrine; Б – proportion of MSCs isolated from young donors at early passages, MSCs isolated from young donors at late passages (replicatively old), MSCs isolated from adipose tissue of elderly patients, responding to serotonin. $N = 12-19$, mean \pm SEM, * $p < 0.05$. Comparison of three independent groups was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. To obtain the results, MSCs isolated from 2 different donors were used in each group; В – representative calcium responses of individual cells to norepinephrine; Г – representative calcium responses of individual cells to serotonin. The periods of time when the hormone was added are marked in gray. The time bars for figures (B) and (D) are the same and are given in the middle between the panels of the figures

Литература

1. Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*. 2003;144(6):2201–2207.
2. Bjorntorp P. Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. *Nutrition*. 1997;13(9):795–803.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317.

4. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641–648.
5. Калинина Н, Сысоева В, Рубина К, Парфенова ЕВ, Ткачук ВА. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей. *Acta Naturae*. 2011;3(4):32–39.
6. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair — current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896–2902.
7. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010;59(1):105–109.
8. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829–834.
9. Tyurin-Kuzmin PA, Dyikanov DT, Fadeeva JI, Sysoeva VY, Kalinina NI. Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Sci Data*. 2018;5:180196.
10. Tyurin-Kuzmin PA, Fadeeva JI, Kanareikina MA, Kalinina NI, Sysoeva VY, Dyikanov DT, et al. Activation of beta-adrenergic receptors is required for elevated alpha1A-adrenoceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells. *Sci Rep*. 2016;6:32835.
11. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366–376.
12. Amireault P, Sibon D, Cote F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(1):64–71.
13. Kotova PD, Sysoeva VY, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Kolesnikova AS, Tyurin-Kuzmin PA, et al. Functional expression of adrenoceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(9):1899–1908.
14. Chechekhin VI, Ivanova AM, Kulebyakin KY, Antropova YG, Karagyaour MN, Skryabina MN, et al. Peripheral 5-HT/HTR6 axis is responsible for obesity-associated hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2024;1871(2):119651.
15. Crane JD, Palanivel R, Mottillo EP, Bujak AL, Wang H, Ford RJ, et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med*. 2015;21(2):166–172.
16. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*. 2006;5(1):91–116.
17. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25(3):585–621.
18. Оловников А. Недорепликация ДНК на краю матрицы (маргинотомия) и проблемы развития организмов. В сб: Проблемы биологии старения М.: Наука, 1983:40–48.
19. Voynova E, Kulebyakin K, Grigorieva O, Novoseletskaia E, Basalova N, Alexandrushkina N, et al. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10:01-14.
20. Efimenko A, Dzhoiyashvili N, Kalinina N, Kochegura T, Akchurin R, Tkachuk V, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells from aged patients with coronary artery disease keep mesenchymal stromal cell properties but exhibit characteristics of aging and have impaired angiogenic potential. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(1):32–41.
21. Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C, Suh Y. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of ageing and development*. 2012;133(5):215–225.
22. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*. 2018;93(1):19–31.

23. Chechekhin VI, Kulebyakin KY, Kalinina NI, Tyurin-Kuzmin PA. Noradrenaline and serotonin-dependent sensitization of MSCs to noradrenaline. *MethodsX*. 2024;12:102587.
24. Tyurin-Kuzmin PA, Karagyaur MN, Kulebyakin KY, Dyikanov DT, Chechekhin VI, Ivanova AM, et al. Functional Heterogeneity of Protein Kinase A Activation in Multipotent Stromal Cells. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(12):4442.
25. Batra N, Kar R, Jiang JX. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2012;1818(8):1909–1918.
26. Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapova I, Zuckerman J, Walcott B, et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *The Journal of physiology*. 2004;555(3):617–626.
27. Лобанова МВ, Ратушный АЮ, Буравкова ЛБ. Экспрессия генов, ассоциированных со старением, в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках при длительном культивировании в условиях разного содержания кислорода. *Доклады Академии наук*. 2016;470(2):227–229.
28. Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1–18.
29. Makarevich PI, Boldyreva MA, Gluhanyuk EV, Efimenko AY, Dergilev KV, Shevchenko EK, et al. Enhanced angiogenesis in ischemic skeletal muscle after transplantation of cell sheets from baculovirus-transduced adipose-derived stromal cells expressing VEGF165. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:204.
30. Tyurin-Kuzmin PA, Hayashi Y, Kulebyakin K. Functional heterogeneity of stem cells. *Frontiers Media SA*; 2023:1179911.
31. Zhang Q, Huang H, Zhang L, Wu R, Chung CI, Zhang SQ, et al. Visualizing Dynamics of Cell Signaling In Vivo with a Phase Separation-Based Kinase Reporter. *Mol Cell*. 2018;69(2):347.
32. Tyurin-Kuzmin PA, Chechekhin VI, Ivanova AM, Dyikanov DT, Sysoeva VY, Kalinina NI, et al. Noradrenaline Sensitivity Is Severely Impaired in Immortalized Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Line. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):1–11.
33. Kulebyakin K, Tyurin-Kuzmin P, Efimenko A, Voloshin N, Kartoshkin A, Karagyaur M, et al. Decreased insulin sensitivity in telomerase-immortalized mesenchymal stem cells affects efficacy and outcome of adipogenic differentiation in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:662078.
34. Stunes A, Reseland JE, Hauso Ø, Kidd M, Tømmerås K, Waldum H, et al. Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011;13(6):551–558.

Об авторах

Чечехина Елизавета Сергеевна — аспирант кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Кулебякин Константин Юрьевич — к.б.н., доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Григорьева Ольга Александровна — к.б.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; научный сотрудник лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ефименко Анастасия Юрьевна — д.м.н., заведующая лабораторией репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич — д.б.н., доцент, доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Authors

Elizaveta S. Chechekhina — PhD student of Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

Konstantin Yu. Kulebyakin — Dr. Sci. (Biology), Associate Professor of Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University; lead scientific fellow, laboratory of molecular endocrinology, Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Olga A. Grigorieva — Dr. Sci. (Biology), senior scientist of Laboratory of Gene and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University; scientist in Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Anastasiya Yu. Efimenko — MD, Dr. Sci. (Medicine), head of Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow; Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Education Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Pyotr A. Tyurin-Kuzmin — Dr. Sci. (Biology), Associate Professor of Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, M.V. Lomonosov Moscow State University.

Вклад авторов

Е.С. Чечехина — выполняла эксперименты, обрабатывала данные, писала текст статьи.

К.Ю. Кулебякин — выполнял эксперименты, участвовал в формулировании идеи, писал текст статьи.

О.А. Григорьева — выполняла эксперименты, обрабатывала данные.

А.Ю. Ефименко — участвовала в формулировании идеи, писала текст статьи.

П.А. Тюрин-Кузьмин — выполнял эксперименты, участвовал в формулировании идеи, писал текст статьи, выполнял общее руководство работой.

Author contribution statement

Elizaveta S. Chechekhina — performing the experiments, experimental data processing, manuscript writing.

Konstantin Yu. Kulebyakin — performing the experiments, conceptualization, manuscript writing.

Olga A. Grigorieva — performing the experiments, manuscript writing.

Anastasiya Yu. Efimenko — conceptualization, manuscript writing.

Pyotr A. Tyurin-Kuzmin — performing the experiments, conceptualization, manuscript writing, supervision.