

УДК 577.352.4

МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО СИГНАЛА В ПРЕДИПОЦИТАХ БУРОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Мухаметдинова Э.С., Кужамбердиева С.Ж., Абжалелов Б.Б.

*Кызылординский государственный университет им. Коркыт Ата, Кызылорда,
e-mail: bakhytbek@mail.ru*

Бурая жировая ткань впервые была описана несколько сот лет назад. Эта ткань локализована близ жизненно важных органов и играет главную роль в производстве тепла, необходимого для поддержания постоянной температуры, в особенности у мелких животных, живущих в условиях холода и/или впадающих в зимнюю спячку, а также у новорожденных, в том числе и человека. К важным свойствам бурой жировой ткани относится её способность наращивать свою массу в случае хронического холодового стресса. Запуск этого процесса, также как и термогенеза, осуществляется в основном норадреналином. Бурая жировая ткань представляет собой хорошую модель для исследования механизмов гормонального контроля за развитием ткани и клеток. В данной работе показано, что кальциевый ответ в свежeweделенных бурых преадипоцитах инициируется главным образом через β -адренорецепторы и далее опосредуется через cAMP/протеинкиназа А-зависимый путь. Это является отличительной чертой бурых преадипоцитов. В зрелых адипоцитах, кальциевый ответ инициируется через α_1 -адренорецепторы.

Ключевые слова: бурая жировая ткань, α, β -адренорецепторы

A MECHANISM OF FORMING OF CALCIUM SIGNAL IS IN PREADIPOCYTES OF BROWN FAT CELLS

Mukhametdinova E.S., Kuzhamberdieva S.Z., Abzhalelov B.B.

Kyzylorda state university, Kyzylorda, e-mail: bakhytbek@mail.ru

Brown fat cells was first described several hundred years back. This fabric is noncommunicative near vital and co-stars in the production of heat necessary for maintenance of stationary temperature, in particular for shallow animals above-ground in the conditions of cold and/or inflowing in hibernation, and also at new-born, including man. Her ability to grow the mass in case of chronic cold stress behaves to important properties of brown fat cells. The start of this process, as well as thermogenesis, comes true mainly by Noradrenalinum. Brown fat cells is a good model for research of mechanisms of hormonal control after development of fabric and cages. In hired it is shown that calcium answer in brown preadipocytes initiated mainly through β -adrenoreceptors and further will mediate through cAMP/proteinkinase of A-pathway. It is the distinguishing feature of brown preadipocytes. In mature adipocytes, calcium answers are initiated through α_1 -adrenoreceptors.

Keywords: brown fat cells, α, β – adrenoreceptors

Бурая жировая ткань впервые была описана несколько сот лет назад. Эта ткань локализована близ жизненно важных органов и играет главную роль в производстве тепла, необходимого для поддержания постоянной температуры, в особенности у мелких животных, живущих в условиях холода и/или впадающих в зимнюю спячку, а также у новорожденных, в том числе и человека.

Нейротрансмиттер норадреналин инициирует термогенез и увеличивает термогенную активность ткани при хроническом холодовом стрессе, стимулируя её гиперплазию и гипертрофию. Норадреналин многократно ускоряет как пролиферацию клеток, так и их дифференцировку. В бурых преадипоцитах норадреналин стимулирует синтез ДНК и белка по cAMP-зависимому пути. В постконфлуентных клетках норадреналин стимулирует экспрессию гена белка-разобшителя. Была показана линейная корреляция между экспрессией гена и повышением cAMP. Таким образом, процессы; пролиферации, дифференцировки и термогенеза, опосредованы одним

и тем же мессенджером – cAMP и инициируются через β -адренорецепторы. Роль α_1 -адренорецепторов в указанных процессах оказалась минорной и сводилась к синергическому усилению сигнала, индуцированного через β -рецепторы и cAMP. В этом случае ионы Ca^{2+} усиливали стимулирующее действие cAMP на термогенез клеток и экспрессию ряда генов [1,2].

Единственным указанием на возможное участие ионов Ca^{2+} в активации пролиферации бурых преадипоцитов являлась установленная ранее корреляция между эффектами нейропептидов на $[Ca^{2+}]_i$ в свежeweделенных преадипоцитах и модуляцией пролиферации культивируемых клеток пептидами при тех же концентрациях. Однако оказалось, что $[Ca^{2+}]_i$, инициируемый норадреналином и пептидами в преадипоцитах и зрелых клетках бурого жира отличается по ряду параметров (кинетики, амплитуда и т.д.). Более того, создавалось впечатление, что Ca^{2+} -сигналы, инициируемые в преадипоцитах разными агонистами, обладают разными физиологическими функциями

в этих клетках и связаны, по-видимому, со стимуляцией противоположно направленных процессов. Поэтому мы считаем весьма важным на первом этапе установить, причины существенных отличий Ca^{2+} -ответов на норадреналин в преадипоцитах и зрелых клетках бурого жира. Это позволит в последующем использовать полученные знания для контролируемого управления за развитием клеток и ткани.

К важным свойствам бурой жировой ткани относится её способность наращивать свою массу в случае хронического холодового стресса. Запуск этого процесса, также как и термогенеза, осуществляется в основном норадреналином. Бурая жировая ткань представляет собой хорошую модель для исследования механизмов гормонального контроля за развитием ткани и клеток [1-6].

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на суспензии свежесыведенных бурых преадипоцитов. Мышей-самцов линии NMRI в возрасте 3-5 недель содержали в отсутствие холодового стресса (температура в помещении 20-23°C). Забор ткани производили из затылочной, межлопаточной и пазушной областей. Бурую жировую ткань помещали в стандартный солевой буфер, содержащий (в мМ): NaCl – 123, KCl – 5, CaCl – 1,3, глюкозы – 5, HEPES – 100, BSA – 1,5%, pH – 7,4. Ткань бурого жира переносили в пробирки с раствором коллагеназы для разрушения межклеточного матрикса. Раствор коллагеназы (0,7-0,8 мг/мл изоляционного буфера) готовили непосредственно перед опытом из расчета 2–2,5 мл раствора на одну мышь. Измельченную ткань инкубировали в растворе коллагеназой на водяной бане при 28°C в течение 20-30 мин, периодически встряхивая на шейкере, и затем охлаждали на льду в течение 15-30 мин. Суспензию клеток фильтровали на нейлоновом фильтре (размер пор 250 мкм) и центрифугировали течение 10 мин при 1200 g. Слой белого жира удаляли и супернатант отбирали шприцем с длинной иглой. Полученный

осадок ресуспендировали в 9 мл среды DMEM с добавлением 10 мМ HEPES и BSA (0,5 мг/мл), pH 7,4, отфильтровывали на нейлоновом фильтре (размер пор 25 микрон) и центрифугировали течение 10 мин при 1200 g. Осадок ресуспендировали в среде DMEM без альбумина. Зрелые адипоциты содержат жировые капли и не осаждаются при данных параметрах центрифугирования.

Измерения $[Ca^{2+}]_i$ проводили спектрофлуориметрически с помощью внутриклеточных ион-селективных флуоресцентных зондов Fura-2/AM. В данной работе мы регистрировали кинетики $[Ca^{2+}]_i$ при аппликации агонистов адренорецепторов в течение 20 минут и далее учитывали и анализировали величину $[Ca^{2+}]_i$ на 20-й минуте. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием программы Origin 7,0.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Роль α_1 - и β -адренорецепторов в формировании Ca^{2+} -сигнала в преадипоцитах бурого жира.

В зрелых бурых адипоцитах норадреналин (НА) и α_1 -селективный агонист циразолин вызывали очень схожие Ca^{2+} -ответы, в то время как влияние изопротеренола на $[Ca^{2+}]_i$ было на два порядка меньше, чем влияние НА и циразолина. В свежесыведенных бурых преадипоцитах эффективность указанных агонистов была совершенно иной. Агонисты α_1 -адренорецепторов: циразолин, фенилефрин (не показано) и оксиметазолин (агонист α_{1A} -рецепторов, которые составляют 80-90 % от α_1 -адренорецепторов в бурой жировой ткани) вызывали в 2-3 раза меньшее увеличение $[Ca^{2+}]_i$ по сравнению с НА, тогда как изопротеренол и НА инициировали в них практически идентичные Ca^{2+} -ответы (рис. 1). Агонист α_2 -адренорецепторов клонидин не имел эффекта в бурых преадипоцитах.

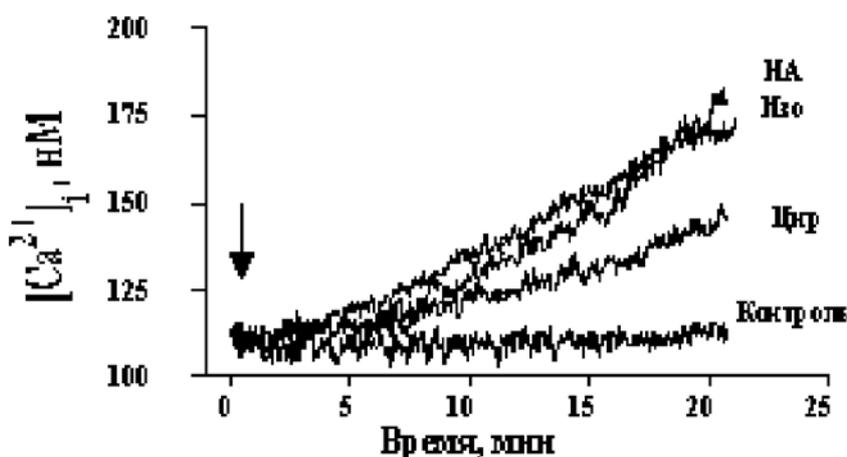


Рис. 1. Кинетика Ca^{2+} -ответов в бурых преадипоцитах, инициированных 3 мМ циразолином (Цир), 3 мМ изопротеренолом (Изо) и 3 мМ норадреналином (НА), контроль

При действии адренергических агонистов наблюдался аддитивный Ca^{2+} -ответ, стимулированный через β - и α_1 -адренорецепторы; $[Ca^{2+}]_i$ при аппликации НА была примерно равна арифметической сумме эффектов изопротеренола и оксиметазолина. Совместная аппликация β - и α_1 -агонистов при максимальной концентрации 10 μ M последних дала в результате Ca^{2+} -ответы, аналогичные эффектам НА. Для того, чтобы подтвердить относительный вклад α_1 - и β -адренорецепторов в НА-иницированный Ca^{2+} -ответ, были исследованы эффекты $\alpha_{1/2}$ - и β -селективных антагонистов- фентоламина и надолола, соответственно. Надолол на 90 % подавлял НА-иницированный Ca^{2+} -ответ, в то время как фентоламин уменьшал Ca^{2+} -ответ только на 25 % (рис.2). Таким образом, оба типа адренорецепторов (α_1 - и β -), вносят вклад в формирование $[Ca^{2+}]_i$, однако главная роль в формировании Ca^{2+} -ответа в бурых преадипоцитах принадлежит β -адренорецепторам [1-6].

2. Действие ингибиторов и активаторов сАМР-зависимого пути на Ca^{2+} -сигнал в преадипоцитах.

Активация β -адренорецепторов клеток бурого жира приводит к опосредованной G_s -белками стимуляции аденилатциклазы (АЦ) и к образованию вторичного мессенджера сАМР. Увеличение внутриклеточного уровня сАМР можно достичь либо добавлением к клеткам проникающего через плазматическую мембрану аналога сАМР-ВсАМР, либо добавлением форсколина- непосредственного активатора АЦ. На рис. 3 представлены кинетики Ca^{2+} -ответов бурых преадипоцитов на норадреналин, ВсАМР и форсколин. Как видно из рисунка, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на форсколин и ВсАМР (кривые 3 и 4) заметно выше, чем при аппликации НА, что еще раз подчеркивает ведущую роль β -адренорецепторов в формировании $[Ca^{2+}]_i$.

Добавление 500 μ M ВсАМР вызывает максимальное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, что следует из колоколообразной кривой дозозависимости (рис. 4).

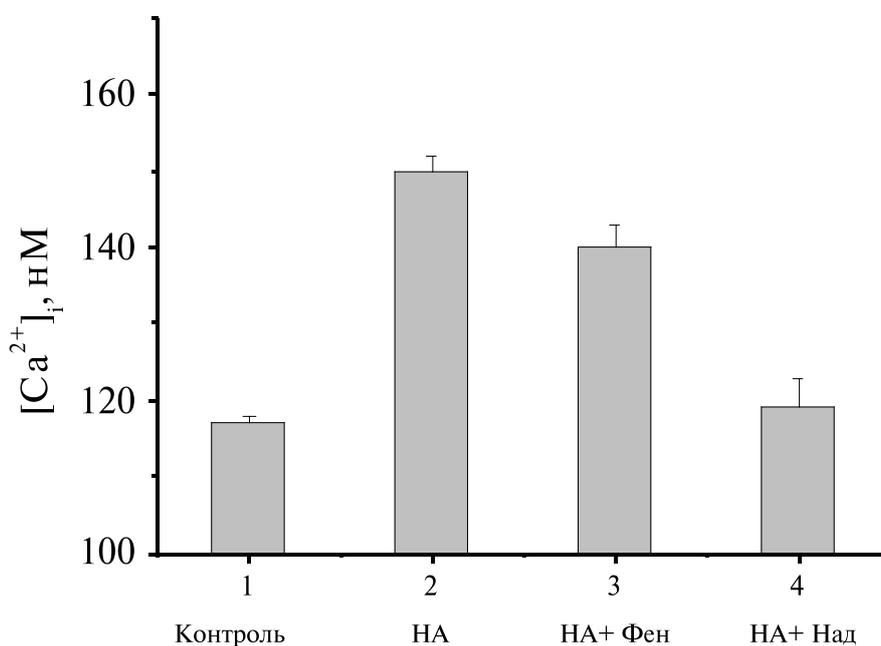


Рис. 2. Влияние селективных антагонистов α_1 - и β -адренорецепторов на НА-иницированный Ca^{2+} -ответ в бурых преадипоцитах: 1 – контроль; 2 – 6 тМ норадреналина (НА); 3 – НА + 10 тМ фентоламина; 4 – НА + 10 тМ надолола. (n=5).
Уровень $[Ca^{2+}]_i$ измеряли через 20 мин после добавления антагонистов

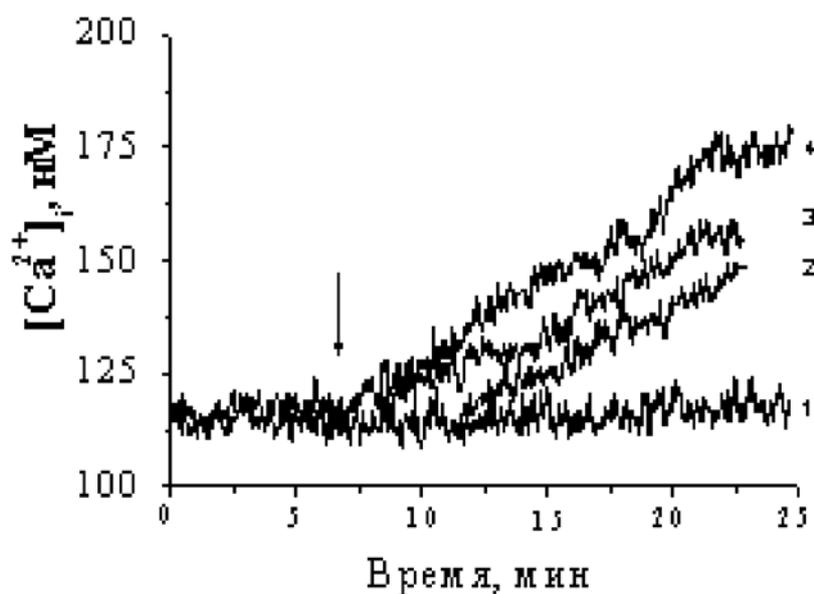


Рис. 3. Изменение Ca^{2+} -ответа в свежевыделенных преадипоцитах под влиянием норадреналина, BrcAMP и форсколина:
1 – контроль; 2 – 1 μ M норадреналин; 3 – 10 μ M форсколин; 4 – 0,5 μ M BrcAMP

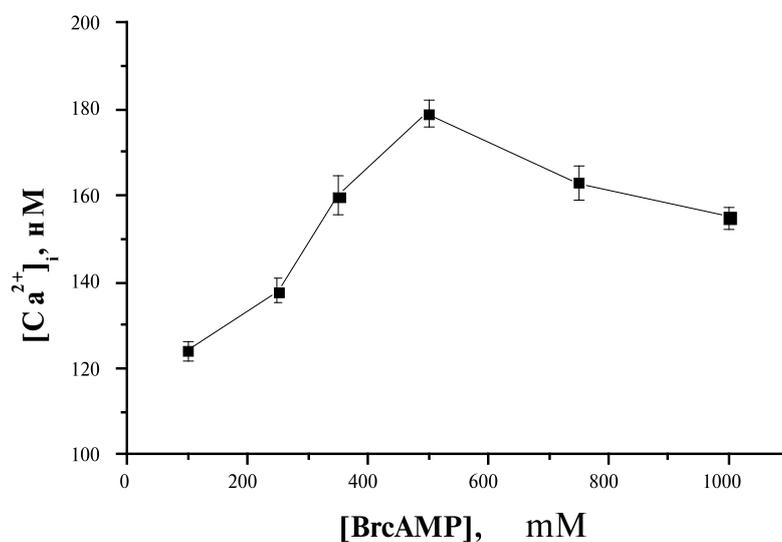


Рис. 4. Зависимость Ca^{2+} -ответа свежевыделенных преадипоцитов от концентрации BrcAMP

В настоящем исследовании показано, что воздействия, приводящие к увеличению сAMP в преадипоцитах, вызывают повышение $[Ca^{2+}]_i$. Известно, что уровень сAMP в клетке определяется балансом между двумя процессами: процессом синтеза, опосредованным активацией аденилатциклазы, и процессом деградации, опосредованным активацией фосфодиэстеразы циклических

нуклеотидов. Неспецифическим ингибитором фосфодиэстераз циклических нуклеотидов является соединение 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX). Оптимальная концентрация IBMX для преадипоцитов бурого жира была выбрана в результате титрования вышеупомянутого ингибитора в широком диапазоне концентраций. Как следует из рисунка 5, 30 μ M является самой

эффективной концентрацией. Таким образом, ингибирование фосфодиэстераз в присутствии IBMX вызывает увеличение уровня cAMP, что в свою очередь увеличивает кальциевый ответ на HA [1-6].

воздействовали на увеличение внутриклеточного уровня cAMP. Подобное явление наблюдалось также на культивируемых зрелых бурых адипоцитах. Совместное применение этих ингибиторов в данном исследо-

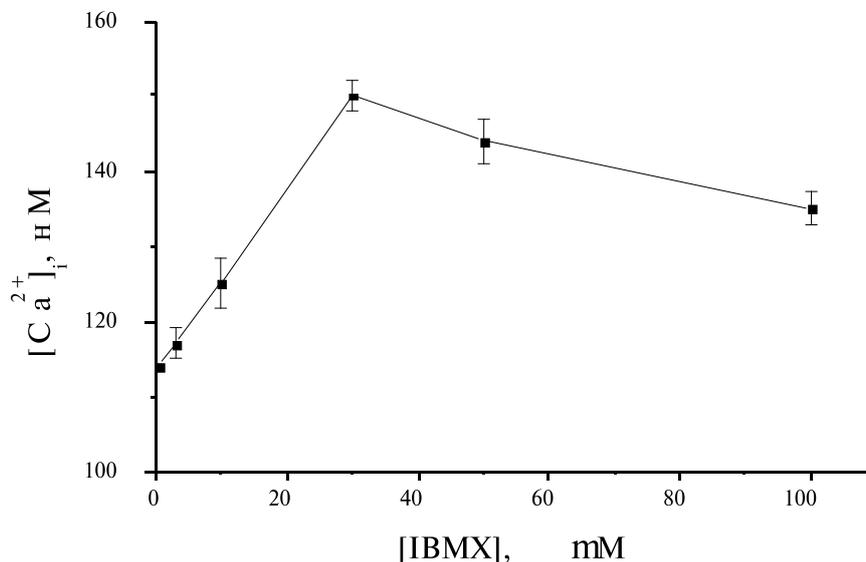


Рис. 5. Зависимость Ca^{2+} -ответа на HA от концентрации IBMX в преадипоцитах

Показано, что в адипоцитах бурого жира наиболее широко представлены фосфодиэстеразы 3- и 4-типов. Селективными ингибиторами фосфодиэстераз 3- и 4-типов являются, такие соединения как OPC-3911 и Ro-20-1724, соответственно.

Ранее было показано, что ингибиторы фосфодиэстераз 3- и 4-типов синергично

влияли на бурых преадипоцитах вызывало меньшее усиление Ca^{2+} -ответа на HA, чем вызывали эти ингибиторы по отдельности (рис. 6). На наш взгляд это полностью согласуется с колоколообразными кривыми дозозависимости эффекта BcAMP (рис. 3) и IBMX (рис. 4) на величину Ca^{2+} -ответа в бурых преадипоцитах.

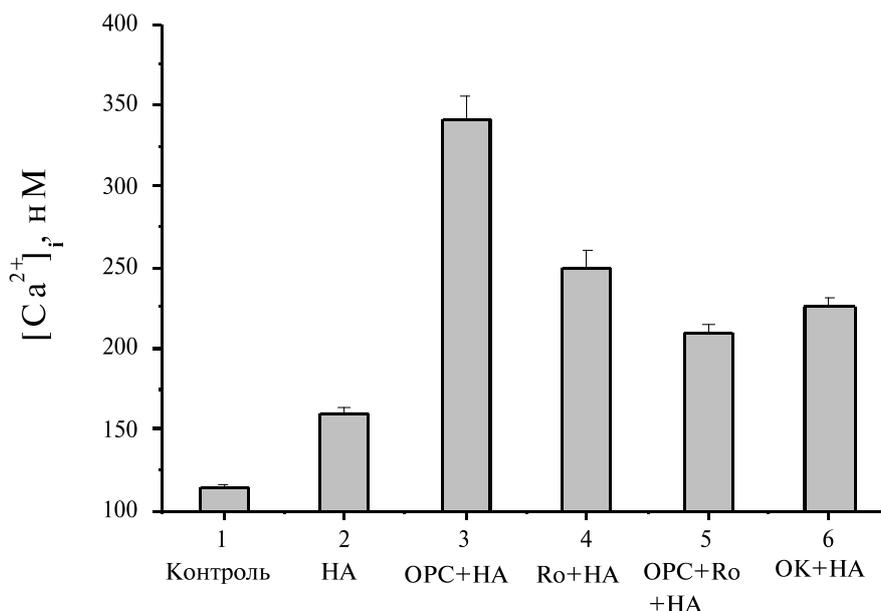


Рис. 6. Влияние ингибиторов фосфодиэстераз и фосфатазы на иницированный HA Ca^{2+} -ответ клеток:

1 – контроль; 2 – 6μM HA; 3 – 0,5 μM OPC-3911+HA; 4 – 15 μM Ro 20-1724+HA; 5 – OPC+Ro+HA; 6 – 30 μM OK+HA

Известно, что активность Ca^{2+} -каналов зрелых клеток модулируется процессами фосфорилирования и дефосфорилирования, осуществляемыми протеинкиназой А и серин-треонин специфической фосфатазой. В данном исследовании установлено, что специфический ингибитор протеинкиназы А (Н-89) подавлял Ca^{2+} -ответы на изопротеренол дозозависимым образом (не показано) и форсколин. Максимальное подавление Ca^{2+} -ответа на форсколин ингибитором ПККА ($[\text{H-89}] = 1 \mu\text{M}$) составляло 55 % (рис. 7). Добавление ингибитора фосфатазы, октадиковой кислоты, существенно увеличивало (рис. 6) Ca^{2+} -ответ на НА. Эти факты говорят в пользу того, что ПККА, фосфатаза и фосфодиэстераза участвуют в процессе формирования Ca^{2+} -ответа на норадреналин в бурых преадипоцитах.

колоколообразная зависимость его величины от концентрации агонистов адренорецепторов или сАМР; в зрелых клетках эти зависимости имели гиперболический или сигмоидальный вид. Согласно классическим представлениям колоколообразная дозозависимость в ответ на действие гормона или нейротрансмиттера указывает на его двойственное действие: он является активатором при низкой концентрации и ингибитором при высокой. Ранее были описаны подобные колоколообразные дозозависимости аккумуляции сАМР в зрелых бурых адипоцитах при аппликации норадреналина и изопротеренола. Ингибирующее действие высоких концентраций (1-10 μM) НА и изопротеренола в этом случае было обусловлено активацией ими Ca^{2+} -сигнала. Возросший уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводил к активации

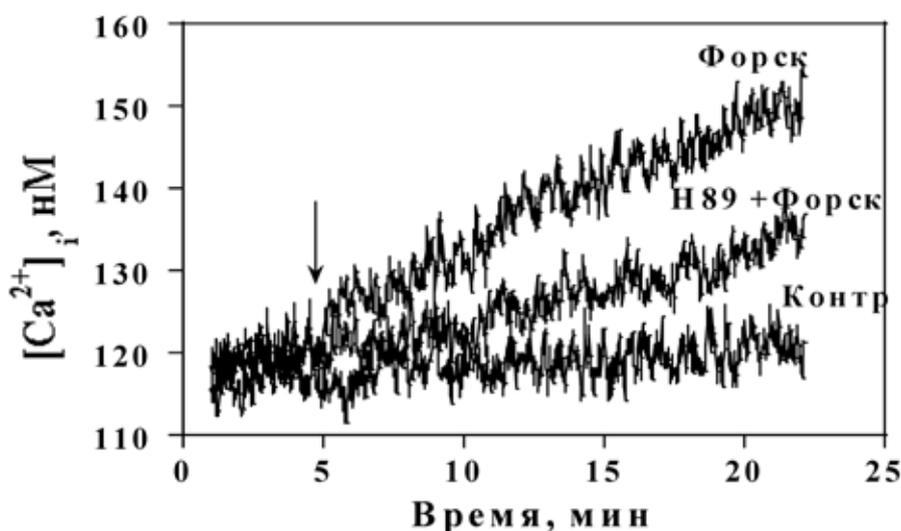


Рис. 7. Влияние ингибитора протеинкиназы А Н-89 (1 μM) на кинетику Ca^{2+} -ответа, инициированного в бурых преадипоцитах форсколином (10 μM)

Таким образом, в данной работе показано, что Ca^{2+} -ответ в свежесыведенных бурых преадипоцитах инициируется главным образом через β -адренорецепторы и далее опосредуется через сАМР/протеинкиназа А-зависимый путь. Это является отличительной чертой бурых преадипоцитов. В зрелых адипоцитах, Ca^{2+} -ответы инициируются через α_1 -адренорецепторы.

Второй отличительной чертой Ca^{2+} -ответа в бурых преадипоцитах является

СаМ/Са²⁺-зависимой фосфодиэстеразы и расщеплению сАМР. Колоколообразный характер кривых может быть связан с наличием отрицательной обратной связи, так например, показано на кардиомиоцитах, что при адренергической стимуляции L-типа Са²⁺-каналов увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводит к подавлению аккумуляции сАМР, связанное в одном случае с Са²⁺-индуцированным ингибированием аденилатциклазы, в другом - с активацией СаМ-зависимой фосфоди-

эстеразы. Более того, с помощью моделирования показано, что наличие двух участков фосфорилирования Ca^{2+} -каналов в большей степени соответствует экспериментальным данным о двойственном эффекте изопротеренола на кардиомиоцитах [1-6].

Список литературы

1. Baumuratov A.S., Abzhalelov B.B., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Bronnikov G.E., Kramarova L.I. Cold adaptation modulates Ca^{2+} signaling in brown preadipocytes // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2004. – Т. 138. № 1. – С. 50-53.
2. Долгачева Л.П., Желозн А., Абжалелов Б.Б., Зинченко В.П., Бронников Г.Е. Сравнение действия регуляторов кальциевой сигнализации на разных уровнях дифференцировки бурых адипоцитов // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2004. – Т. 21. № 5. – С. 397.
3. Абжалелов Б.Б. Механизмы формирования Ca^{2+} -сигнала в преадипоцитах бурой жировой ткани: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Институт биофизики клетки Российской академии наук. – Пущино, 2003.
4. Dolgacheva L.P., Abzhalelov B.B., Zinchenko V.P., Bronnikov G.E., Zhang S.-J. Norepinephrine induces slow calcium signaling in murine brown preadipocytes through the β -adrenoceptor/cAMP/protein kinase A pathway // *Cellular Signalling*. – 2003. – Т. 15. № 2. – С. 209-216.
5. Долгачева Л.П., Абжалелов Б.Б., Баумуратов А.С., Зинченко В.П., Бронников Г.Е. Аденилатциклазный путь участвует в регуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} в преадипоцитах бурого жира // *Цитология*. – 2002. – Т. 44. № 1. – С. 56-60.
6. Баумуратов А.С., Абжалелов Б.Б., Долгачева Л.П., Крамарова Л.И., Зинченко В.П., Бронников Г.Е. Акклимация к холоду вызывает перестройку Ca^{2+} -сигнализации в бурых преадипоцитах. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2004. – № 7. – С. 59-62.