

Ca²⁺-СИГНАЛИЗАЦИЯ В ПРЕАДИПОЦИТАХ БУРОГО ЖИРА СУСЛИКОВ *SPERMOPHILLUS UNDULATUS* И МЫШЕЙ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

© Л. П. Долгачева,¹ М. В. Конаков, Т. А. Агафонова, В. В. Рыбина,
В. П. Зинченко, Г. Е. Бронников

Институт биофизики клетки РАН, Пущино;

¹ электронный адрес: dolgacheva@mail.ru

Проведен сравнительный анализ Ca²⁺-ответов бурых преадипоцитов сусликов *Spermophilus undulatus* и мышей на добавление Ca²⁺-мобилизующих агентов: норадреналина, тапсигаргина, тимеросала и иономицина. Ca²⁺-ответ преадипоцитов бурого жира сусликов на норадреналин в физиологическом диапазоне концентраций агониста практически отсутствует. Использование SH-реагента тимеросала указывает на редукцию системы входа ионов Ca²⁺ в клетках-предшественниках обоих видов. Внутриклеточные запасы Ca²⁺, мобилизуемые тапсигаргином и иономицином в бескальциевой среде, весьма незначительны. Вход Ca²⁺ в преадипоциты не активировался истощением внутриклеточных запасов. Ca²⁺-ответы преадипоцитов сусликов не зависели ни от физиологического состояния животных, ни от сезона года. Бурые преадипоциты сусликов *S. undulatus* можно отнести к высокоиономицин-резистентным клеткам с редуцированной Ca²⁺-системой сигнализации.

Ключевые слова: бурые преадипоциты, норадреналин, хладоадаптация, гибернация, Ca²⁺-сигнальная система.

Принятые сокращения: БЖТ — бурая жировая ткань, НА — норадреналин, ССБ — стандартный солевой буфер, [Ca²⁺]_i — внутриклеточная концентрация кальция, ЭР — эндоплазматический ретикулум.

Бурая жировая ткань (БЖТ) впервые была обнаружена у животных, живущих в условиях холода и впадающих в зимнюю спячку (гибернацию), к которым относятся и суслики *Spermophilus undulatus* (Gessner, 1551; Rasmussen, 1923). Много позже была высказана (Smith, 1961; Smith, Hock, 1963) и далее развита идея о том, что «бурая жировая ткань является важнейшим термогенным органом, необходимым для пробуждения животных от зимней спячки» (Nedergaard, Cannon, 1984). В заметных количествах эта ткань также присутствует у новорожденных многих видов и у животных, адаптированных к холоду, обеспечивая им возможность защиты от переохлаждения. БЖТ локализуется вдоль магистральных кровеносных сосудов и вблизи таких жизненно важных органов, как сердце, легкие и почки.

Развитие и функционирование БЖТ при хладоадаптации находятся под адренергическим контролем: норадреналин (НА) управляет термогенными процессами, регулируя производство тепла митохондриями путем активации белка-разобчителя (UCP1), а также стимулируя экспрессию гена UCP1 в зрелых бурых адипоцитах (Puigserver et al., 1996; Valladares et al., 2000). При хроническом воздействии НА вызывает пролиферацию клеток-предшественников бурых адипоцитов, увеличивая тем самым массу и термогенный потенциал БЖТ (Cannon et al., 1990; Bronnikov et al., 1992). Однако у новорожденных и отчасти у гибернаторов развитие БЖТ не может быть объяснено в пределах гипотезы о ключевой роли адренергиче-

ской системы. Ранее было показано, что развитие клеток-предшественников бурых адипоцитов как в культуре, так и *in vivo* у мышей может регулироваться не только адренергическими агонистами, но и нейропептидами (Bronnikov et al., 1997; Бронников и др., 2006). При этом наблюдается активация медленной Ca²⁺-сигнализации и НА, и нейропептидами. Также было найдено, в процессе хладоадаптации мышей у них в бурых адипоцитах в течение нескольких недель происходит постепенная трансформация медленной низкоамплитудной Ca²⁺-сигнальной системы в сигнализацию быстрого типа, когда клетки отвечают на норадреналин ростом [Ca²⁺]_i до 1000 нМ (Баумуратов и др., 2004).

Слабодифференцированные предшественники бурых преадипоцитов как гомеотермных, так и зимнеящих животных практически не исследованы. В настоящей работе предпринята попытка оценить чувствительность к НА преадипоцитов бурого жира сусликов *S. undulatus*, а также состояние их Ca²⁺-сигнальной системы по сравнению с преадипоцитами бурого жира мышей.

Материал и методика

Эксперименты проводили на суспензии бурых преадипоцитов, выделенных из БЖТ зимнеящих сусликов *S. undulatus* и мышей-самцов линии NMRI. Зимнеящие суслики были отловлены в Якутии, их содержали в специ-

альном помещении, обеспечивая пищей и водой при естественной длине светового дня и температуре окружающей среды, следующей за ее сезонными изменениями (от 20—23 °С летом и до -3 °С зимой). Мышцы самцов линии NMRI в возрасте 3—5 нед содержали в отсутствие холодового стресса (температура в помещении 20—23 °С).

Забор ткани производили из затылочной, межлопаточной и пазушной областей. Кусочки бурого жира помещали в чашку Петри с 2 мл охлажденного изоляционного буферного раствора (Nèchad et al., 1983).

БЖТ очищали от белой жировой ткани, соединительной ткани и крови, затем тщательно измельчали с помощью ножниц и переносили в пробирки с раствором коллагеназы (200 У/мл) для удаления внеклеточного матрикса. Раствор коллагеназы (0.7—0.8 мг/мл изоляционного буферного раствора) готовили непосредственно перед опытом из расчета 7.5 мл раствора на 1 г ткани. Измельченную ткань инкубировали в растворе с коллагеназой на водяной бане при 28 °С в течение 25 мин, периодически встряхивая, и затем охлаждали на льду в течение 15—30 мин. Суспензию клеток фильтровали на нейлоновом фильтре (размер пор 250 мкм) и центрифугировали при 2700 об/мин в течение 10 мин на центрифуге K-23 (ML W, Германия). Слой белого жира удаляли и супернатант отбирали шприцем с длинной иглой. Полученный осадок ресуспендировали в 9 мл/г среды DMEM с добавлением 10 мМ HEPES и BSA (0.5 мг/мл), pH 7.4, отфильтровывали на нейлоновом фильтре (размер пор 25 мкм) и центрифугировали при 2700 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM (без альбумина). Зрелые адипоциты содержат жировые капли и не осаждаются при данных параметрах центрифугирования.

Далее клетки нагружали флуоресцентным зондом. Для этого суспензию клеток ($1 \cdot 10^7$ кл./мл) инкубировали с 2 мкМ флуоресцентного красителя Fura-2/AM в течение 40 мин при 37 °С. Окрашенные клетки отмывали от внешнего красителя и ресуспендировали в ССБ (HANK'S + HEPES; в мМ): CaCl₂ — 1.26, KCl — 5.36, KH₂PO₄ — 0.44, MgCl₂ · 6H₂O — 0.49, MgSO₄ · 7H₂O — 0.41, NaCl — 137, Na₂HPO₄ · 7H₂O — 0.34 с добавлением 10 мМ HEPES, pH 7.2, при 37 °С. Эксперименты проводили на спектрофлуориметре с термостатированной (37 °С) ячейкой (Холмухамедов и др., 1980). Сигналы регистрировали на компьютере при помощи программы Record 4. Уровень [Ca²⁺]_i в клетках измеряли по флуоресценции зонда Fura-2/AM (12) в среде, содержащей кальций (HANK'S + HEPES), либо в бескальциевой среде (ССБ без добавления CaCl₂, но с добавлением 0.5 мМ ЭГТА). Длина волны возбуждения флуоресценции 337 нМ, регистрации — 520 нМ. [Ca²⁺]_i рассчитывали по формуле.

$$[Ca^{2+}]_i = K_d(F - F_{min}) / (F_{max} - F),$$

где F — наблюдаемая интенсивность флуоресценции, F_{max} — флуоресценция красителя, насыщенного Ca²⁺, F_{min} — флуоресценция красителя, свободного от Ca²⁺, K_d = 224 нМ при 37 °С.

F_{max} измеряли после добавления 6 мкМ дигитонина к клеткам в среде с Ca²⁺, F_{min} измеряли после добавления 4 мМ ЭГТА. Уровень собственной флуоресценции вычитали после добавления 100 мкМ Mn²⁺.

Для обработки результатов использовали программы Excel и Origin 7.0.

В работе использовали: CaCl₂ (Flow Laboratories, США); NaCl («хч»), KCl («осч») и глюкозу («ч») («Реа-

хим», Россия); тапсигаргин, иономицин, тимеросал, NE-PES, DMEM, среду Хенкса и Fura-2/AM (Sigma, США); BSA (Serva, Германия); коллагеназу (Worthington); норадrenalин (Synthelabo Recherche, Швеция).

Результаты

Взаимодействие НА с рецепторами зрелых клеток бурого жира инициирует генерацию таких вторичных мессенджеров, как сАМР, диацилглицерол, инозитолтрифосфат и ионы Ca²⁺ (Connolly et al., 1984; Connolly, Nedergaard, 1988; Bronnikov et al., 1992). Адипоциты бурого жира являются электроневоозбудимыми клетками, и Ca²⁺-ответ дифференцированных клеток на НА по форме и амплитуде можно отнести к типичным ответам невозбудимых клеток, где происходит инозитолтрифосфатзависимая мобилизация Ca²⁺ из внутриклеточных структур, индуцирующая в свою очередь массивный вход Ca²⁺ в клетки из экстраклеточной среды (Nanberg, Putney, 1986; Nedergaard et al., 1986; Zhang, 1999). В то же время Ca²⁺-ответы преадипоцитов бурого жира НА существенно более медленны, весьма малы по амплитуде и управляются в основном ключевыми молекулами аденилатциклазного, а не фосфоинозитидного пути (Dolgacheva et al., 2003). В ряде работ, выполненных на зрелых адипоцитах и преадипоцитах бурого жира, показано, что Ca²⁺- и сАМР-ответы на НА наблюдаются в диапазоне концентраций последнего от 0.01 до 10.00 мкМ (Bronnikov et al., 1999). На рис. 1, а показана зависимость амплитуды Ca²⁺-ответов преадипоцитов бурого жира мышей и сусликов от концентрации НА.

На рис. 1, а, 1 видно, что максимальное увеличение [Ca²⁺]_i в преадипоцитах мыши не превышало примерно 50—60 нМ, что на порядок меньше величины ответа дифференцированных адипоцитов (Bronnikov et al., 1999). Ca²⁺-ответ на НА преадипоцитов бурого жира сусликов в этом диапазоне концентраций агониста практически отсутствует (рис. 1, а, 2). Он появляется только при добавлении НА в концентрации 10 мкМ и выше (рис. 1, б), достигая в оптимуме концентрации НА величины 600 нМ [Ca²⁺]_i. Следует подчеркнуть, что Ca²⁺-ответы, представленные на рис. 1, зарегистрированы на 20-й мин после добавления агониста. Подобные ответы могут свидетельствовать в пользу того, что Ca²⁺-система преадипоцитов бурого жира обоих видов существенно более медленная, чем в зрелых клетках, а также она значительно редуцирована в области физиологических концентраций НА.

Тимеросал, взаимодействуя с SH-группами Ca²⁺-каналов, фиксирует их в открытом состоянии (Гуковская и др., 1992; Gukovskaya et al., 1992; Chen et al., 1998), что позволяет по величине клеточных ответов судить о проводимости и о числе клеточных Ca²⁺-каналов. На рис. 2 представлена кинетика Ca²⁺-ответов на тимеросал (рис. 2, а) преадипоцитов бурого жира сусликов и зависимость максимальной величины [Ca²⁺]_i преадипоцитов мышей и сусликов от концентрации агента (рис. 2, б).

Кинетика Ca²⁺-ответа на тимеросал может быть описана уравнением первого порядка, где константы скорости слабо зависят от концентрации агента и для клеток сусликов находятся в области 0.5—0.7 мин⁻¹. Для клеток мышей эти величины в среднем в 2 раза выше и составляют 0.95—1.45 мин⁻¹. Точки на графике (рис. 2, б) соответствуют максимуму Ca²⁺-ответа (плато кинетики), который не превышает 210—220 нМ. Как видно, кривые дозозави-

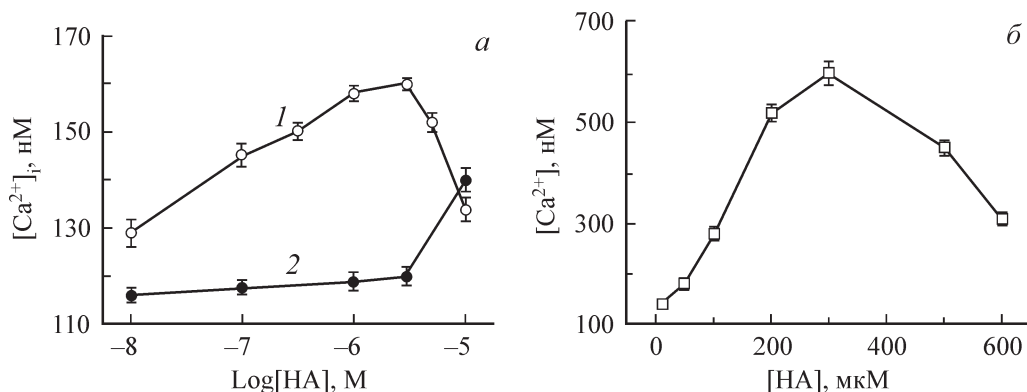


Рис. 1. Зависимость внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в бурых преадипоцитах от концентрации норадrenalина (НА).

Уровень $[Ca^{2+}]_i$ в среде, содержащей Ca^{2+} , измеряли через 20 мин после добавления НА. а — низкие концентрации НА; 1 — мыши, 2 — суслики. б — высокие концентрации НА для сусликов; $n = 6$.

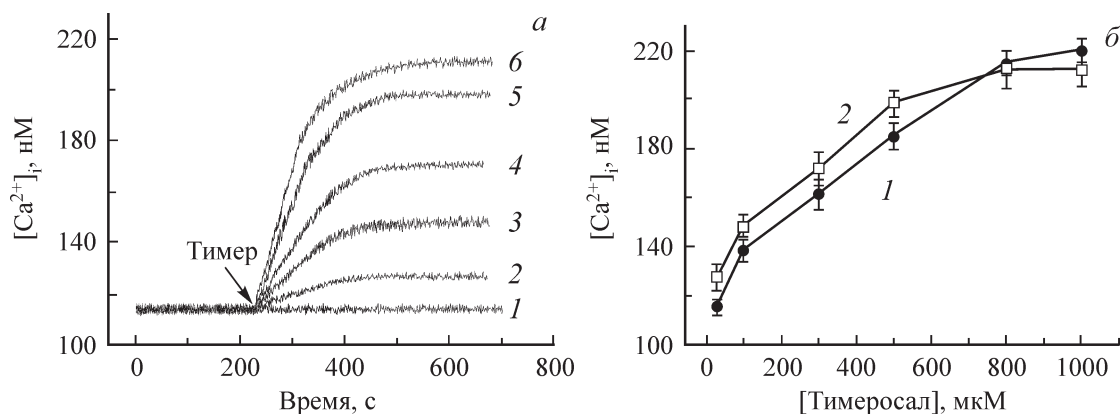


Рис. 2. Кальциевые ответы в преадипоцитах сусликов и мышей под действием тимеросала (2—1000 мкМ).

Среда с кальцием. а — типичная кинетика роста $[Ca^{2+}]_i$ в клетках сусликов (1 из 4 экспериментов): 1 — контроль, 2 — 30 мкМ, 3 — 100, 4 — 300, 5 — 500, б — 1000 мкМ тимеросала. б — зависимость максимального уровня $[Ca^{2+}]_i$ в преадипоцитах мышей (1) и сусликов (2) от концентрации тимеросала.

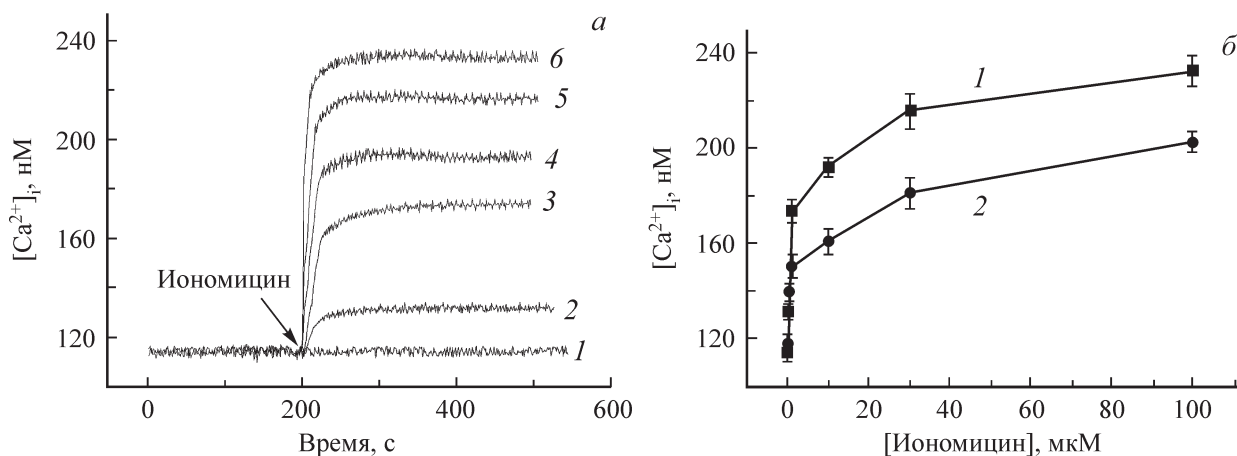


Рис. 3. Кальциевые ответы в преадипоцитах сусликов и мышей под действием иономицина (0.03—100.00 мкМ).

Среда с кальцием. а — типичная кинетика роста $[Ca^{2+}]_i$ в клетках сусликов (1 из 4 экспериментов): 1 — контроль, 2 — 0.03 мкМ, 3 — 1, 4 — 10, 5 — 30, 6 — 100 мкМ. б — зависимость максимального уровня $[Ca^{2+}]_i$ в преадипоцитах мышей (1) и сусликов (2) от концентрации иономицина.

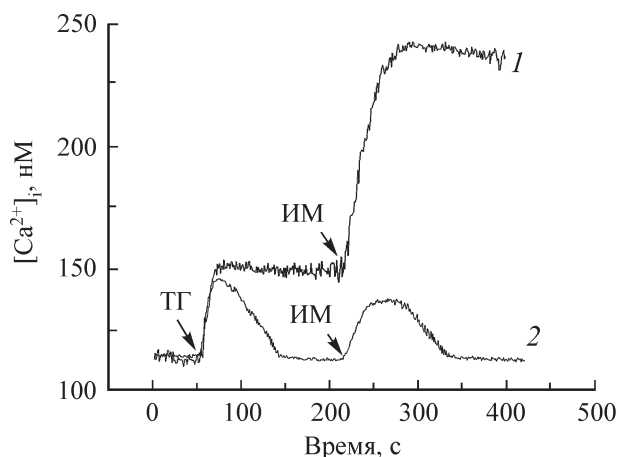


Рис. 4. Кинетика изменений $[Ca^{2+}]_i$ в преадипоцитах бурого жира сусликов в ответ на добавление 1 мкМ тапсигаргина (ТГ) и 1 мкМ иономицина (ИМ).

1 — среда с кальцием, 2 — бескальциевая среда.

симые для клеток обоих видов практически не различаются, концентрация тимеросала, вызывающая полумаксимальный ответ, составляет примерно 230 мкМ. Используемые в этих опытах концентрации тимеросала являются очень высокими, тем не менее $[Ca^{2+}]_i$ не удалось увеличить до 1 мкМ, как это происходило в дифференцированных культивируемых бурых адипоцитах (Долгачева и др., 2004). Данный факт говорит в пользу того, что Ca^{2+} -каналы клеток-предшественников обладают слабой проводимостью и (или) их количество на плазматической мембране незначительно.

Известно, что добавление Ca^{2+} -ионофора иономицина к суспензии клеток приводит к повышению $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле. Для ряда клеток показано, что добавление больше 1 мкМ иономицина приводит к неограниченному росту $[Ca^{2+}]_i$ и гибели клеток (Дедкова и др., 1999). На рис. 3 представлены кинетика Ca^{2+} -ответов на иономицин (рис. 3, а) преадипоцитов бурого жира сусликов и зависимость максимального уровня $[Ca^{2+}]_i$ в клетках обоих видов от концентрации ионофора (рис. 3, б).

На рис. 3, а видно, что использование даже очень высоких концентраций иономицина (100 мкМ) не приводит к неограниченному росту $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле. Как и в случае с тимеросалом, кинетика Ca^{2+} -ответа на иономицин преадипоцитов обоих видов может быть описана уравнением первого порядка.

Однако если константы скорости для клеток мышей находятся в диапазоне 1.5—2.8 мин⁻¹ и практически не зависят от концентрации ионофора, то для клеток сусликов константы скорости увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле определены равными 2.8—15.5 мин⁻¹, они растут пропорционально росту флуоресценции используемого в опыте иономицина.

Кривые дозависимости максимального клеточного ответа на иономицин (рис. 3, б) в отличие от кривых для действия тимеросала различаются: для преадипоцитов мышей кривая идет существенно ниже кривой для клеток сусликов, хотя они обе имеют одинаковые концентрации полумаксимальной активации, равные примерно 2.5 мкМ иономицина.

Внутриклеточные запасы Ca^{2+} и наличие зависимости входа Ca^{2+} в клетку от процесса опустошения эндоплазматического ретикулума (ЭР) можно оценить из сопостав-

ления измерений концентрации кальция в цитозоле в ответ на добавление тапсигаргина и иономицина в бескальциевой и содержащей кальций средах (Gukovskaya, Zinchenko, 1990). Тапсигаргин, специфический ингибитор Ca^{2+} -АТФазы ЭР, вызывает мобилизацию Ca^{2+} из ретикулума (Thastrup et al., 1990). На рис. 4 представлена кинетика изменения $[Ca^{2+}]_i$ в преадипоцитах бурого жира сусликов в ответ на добавление тапсигаргина и иономицина в среде, содержащей кальций (рис. 4, 1), и в бескальциевой среде (рис. 4, 2).

Как видно на рис. 4, 1, в среде с кальцием добавление тапсигаргина приводит лишь к незначительному повышению $[Ca^{2+}]_i$, что указывает на очень малые внутриклеточные запасы Ca^{2+} и отсутствие входа Ca^{2+} , зависящего от опустошения ретикулума (так называемого емкостного входа ионов Ca^{2+}). Последующее добавление иономицина приводит к увеличению уровня Ca^{2+} лишь до 240 нМ. Таким образом, даже ингибирование Ca^{2+} АТФазы ЭР не мешает преадипоцитам бурого жира поддерживать достаточно низкую концентрацию ионов кальция в цитозоле, несмотря на добавление ионофора. Добавление тапсигаргина к клеткам в бескальциевой среде (рис. 4, 2) подтвердило практически полное отсутствие запасов Ca^{2+} в ЭР. Последующее добавление иономицина не привело к заметному увеличению уровня Ca^{2+} , что свидетельствует об отсутствии других Ca^{2+} -пулов в этих клетках.

Обсуждение

Как уже упоминалось, кинетика и амплитуда Ca^{2+} -ответов зрелых клеток бурого жира мышей находятся в диапазоне, характерном для большинства электронезбудимых клеток. Ca^{2+} -ответы преадипоцитов бурого жира сусликов отличаются не только от Ca^{2+} -ответов зрелых клеток бурого жира мышей, но и от Ca^{2+} -ответов бурых преадипоцитов мышей. Норадреналин в концентрациях, которые являются оптимальными для регистрации Ca^{2+} - и сАМР-ответов в зрелых дифференцированных бурых адипоцитах и в преадипоцитах бурого жира мышей и крыс (0.01—10.00 мкМ), не вызывал заметных клеточных ответов в преадипоцитах бурого жира сусликов. В бурых преадипоцитах мышей наибольшие ответы наблюдались при 3—5 мкМ НА, при этом уровень Ca^{2+} в клетках обычно повышался не более чем на 50—100 нМ за 20 мин; более высокие концентрации агониста подавляли Ca^{2+} -сигнал. Ранее было показано, что столь малая амплитуда изменений и медленная скорость клеточных ответов обусловлены редукцией Ca^{2+} -системы сигнализации в бурых преадипоцитах мышей (Долгачева и др., 1999, 2004). Как показано в этих статьях, бурые преадипоциты суслика также имеют сильно редуцированную Ca^{2+} -сигнальную систему и еще меньшую чувствительность к действию НА по сравнению с бурыми преадипоцитами мыши. В то же время представленные результаты свидетельствуют о том, что в определенных условиях, воздействуя на бурые преадипоциты сусликов очень высокими концентрациями НА (100—1000 мкМ), можно вызвать индукцию в них Ca^{2+} -ответов, по амплитуде практически таких же, что ранее наблюдались в зрелых бурых адипоцитах мышей (Bronnikov et al., 1999).

Различия в свойствах Ca^{2+} -систем в преадипоцитах этих двух видов небольшие: как чувствительность клеток к действию тимеросала и иономицина, так и максимальные эффекты этих агентов или идентичны, или очень

близки (рис. 2, 3). В то же время найдены различия в кинетике ответа преадипоцитов двух видов на тимеросал и иономицин. Кинетика накопления Ca^{2+} в цитозоле клеток сусликов под действием тимеросала всего в 2 раза медленнее, чем в клетках мышей, что вряд ли может сыграть большую роль в объяснении столь значительной разницы во внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализации, инициируемой в этих клетках НА. Однако существенное различие между видами, найденное в кинетике стимулированной иономицином ионов Ca^{2+} -сигнализации в преадипоцитах сусликов, указывает на примерно 5—10-кратное различие в величине кинетических констант, что уже может служить отправной точкой для объяснения 10—30-кратных различий в кинетике НА-индуцированной сигнализации. Уже сейчас можно сделать заключение о том, что механизмы Ca^{2+} -сигнальных систем в преадипоцитах этих видов устроены несколько по-разному: кинетические константы транспорта ионов Ca^{2+} в клетки мышей под действием тимеросала и иономицина практически не зависят от концентрации агентов, в то время как кинетическая константа входа ионов в преадипоциты сусликов под действием иономицина растет пропорционально концентрации ионофора в среде (коэффициент корреляции $R = 0.998$).

В ряде работ показано, что тимеросал в концентрации 10—20 мкМ вызывает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до 1—2 мкМ в гепатоцитах и клетках HeLa (Missiaen et al., 1991; Bootman et al., 1992; Сигова и др., 2000). В преадипоцитах бурого жира сусликов тимеросал повышал $[\text{Ca}^{2+}]_i$ лишь при очень высоких концентрациях (начиная с 100 мкМ). Тимеросал также способен запускать выброс ионов кальция из инозитолтрифосфат-чувствительных пулов (Thastrup, 1990; Missiaen et al., 1991; Bootman et al., 1992; Berridge, 1993). Однако добавление тапсигаргина и иономицина к преадипоцитам сусликов в бескальциевой среде не выявило существенных внутриклеточных Ca^{2+} -пулов. Отсюда можно заключить, что внутриклеточные Ca^{2+} -пулы не вносят вклада в повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ под действием тимеросала и что его эффект определяется суммарной проводимостью Ca^{2+} -каналов этих клеток, которая весьма низка.

Ca^{2+} -ионофоры применяются для получения максимального Ca^{2+} -сигнала за счет превышения входа Ca^{2+} над активностью систем вывода этого иона из клеток. Концентрация иономицина, необходимая для достижения этого эффекта, зависит от типа клеток: 0.1 мкМ — для навивных Т-клеток (Сигова и др., 2000), 1 мкМ — для нейтрофилов (Дедкова и др., 1999) и тимоцитов (Гуковская и др., 1992), 30 мкМ — для бурых адипоцитов мыши (Долгачева и др., 1999) и асцитной карциномы Эрлиха (Дедкова и др., 1999). В преадипоцитах бурого жира сусликов *Spermophilus undulatus* и мышей система вывода ионов кальция из клетки не позволяет значительно увеличить $[\text{Ca}^{2+}]_i$, даже под действием очень высоких (100 мкМ) концентраций ионофора. Этот факт свидетельствует о резистентности данных клеток к действию иономицина.

Резистентность к фармакологическим соединениям определяется либо наличием в клетках специфической системы множественной лекарственной устойчивости (Nagy et al., 2004), либо сверхэкспрессией и (или) повышенной активностью Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны (Brini et al., 2000; Guerini et al., 2000). Резюмируя, можно сказать, что, с одной стороны, Ca^{2+} -сигнальная система преадипоцитов бурого жира зимнепящих сусликов содержит незначительные Ca^{2+} -пулы и Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны обладают слабой проводимостью и (или) их количество незначительно, а с другой — что

эти клетки обладают очень мощными системами откачки ионов кальция из цитозоля.

Как ранее мы показали у мышей, при хлададаптации в бурых преадипоцитах происходит трансформация их редуцированной Ca^{2+} -системы, сопровождающаяся примерно 10-кратным ростом Ca^{2+} -ответов на НА и изменение пути стимуляции Ca^{2+} -сигнализации с β - на α_1 -рецептор, индуцируемого 2—3-кратным ростом числа этих рецепторов (Баумуратов и др., 2004); чувствительность клеток к НА при этом заметно не изменялась. Можно было бы предположить существование сезонных изменений плотности адренергических рецепторов в БЖТ сусликов, но этого нами не было найдено (Крамарова и др., 2003). Кроме того, все изменения холода происходят в клетках мышей в течение 2—4 нед, тогда как в клетках сусликов латентная способность повышать $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до уровня 600—900 нМ в ответ на воздействие 300 мкМ НА существует во все сезоны года. Мы же оценили эндогенную концентрацию НА в БЖТ мышей в условиях холодного стресса «всего» в 10—15 мкМ (Бронников и др., 2006), что существенно ниже.

Таким образом, можно предположить, что сезонная гиперплазия БЖТ у сусликов происходит не под действием адренергической системы, а под действием иных гормональных изменений, имеющих годовой цикл и напрямую не зависящих от температурных изменений в окружающей среде. Ранее нами было показано, что некоторые нейропептиды способны регулировать пролиферацию бурых преадипоцитов мыши в культуре и на уровне целостного организма (*in vivo*) и что эффекты этих пептидов коррелируют со стимуляцией медленной Ca^{2+} -системы в бурых преадипоцитах (Бронников et al., 1997; Бронников и др., 2006). Возможно, что этот процесс в клетках у сусликов находится под контролем не только адренергической, но и какой-то другой, возможно пептидергической, системы регуляции, что позволяет производить перестройки в системе Ca^{2+} -сигнализации бурых преадипоцитов при физиологических концентрациях гормонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 2-04-48787 и 05-04-48942).

Список литературы

- Баумуратов А. С., Абжалелов Б. Б., Крамарова Л. И., Долгачева Л. П., Зинченко В. П., Бронников Г. Е. 2004. Акклимация к холоду вызывает перестройку Ca^{2+} -сигнализации в бурых преадипоцитах. Бюл. эксперим. биол. мед. 138 (7) : 59—62.
- Бронников Г. Е., Колаева С. Г., Крамарова Л. И., Долгачева Л. П. 2006. Киоторфин подавляет пролиферацию и кальциевую сигнализацию в бурых преадипоцитах. Бюл. эксперим. биол. мед. 141 (2) : 184—186.
- Гуковская А. С., Котелевская С. М., Трепакова Е. С., Зинченко В. П. 1992. Влияние SH-реактанта тимеросала на Ca^{2+} -гомеостаз в тимоцитах. Биол. мембраны. 9 (2) : 158—165.
- Дедкова Е. Н., Сигова А. А., Зинченко В. П. 1999. О механизме активирующего действия Ca^{2+} -ионофоров на интактные клетки: ионофор-резистентные клетки. Биол. мембраны. 16 (3) : 292—301.
- Долгачева Л. П., Галитовская Е. Н., Зинченко В. П., Бронников Г. Е. 1999. Редуцирование Ca^{2+} -транспортирующих систем в молодых клетках бурого жира мыши. Биол. мембраны. 16 (4) : 410—415.
- Долгачева Л. П., Желозн А., Абжалелов Б. Б., Зинченко В. П., Бронников Г. Е. 2004. Сравнение действия регулято-

ров кальциевой сигнализации на разных уровнях дифференцировки бурых адипоцитов. Биол. мембраны. 21 (4) : 309—317.

Крамарова Л. И., Бронников Г. Е., Игнатьев Д. А., Cannon B., Nedergaard J. 2003. Исследование α_1 -адренергических рецепторов в бурой жировой ткани сусликов в цикле спячка—пробуждение. В кн.: Сб. науч. тр. Междунар. конф. «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Пушкино: Изд-во ОНТИ. 74—77.

Сигова А. А., Дедкова Е. Н., Зинченко В. П., Литвинова И. С. 2000. Редукция Ca²⁺-транспортирующих систем в Т-клетках памяти. Биол. мембраны. 17 (1) : 80—87.

Холмухамедов Э. Л., Зинченко В. П., Евтодиенко Ю. В. 1980. Автоколебания потоков ионов и редокс-состояния дыхательной цепи в митохондриях. Биофизика. 25 : 124—128.

Berridge M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signaling. Nature. 361 : 315—325.

Bootman M. D., Taylor C. W., Berridge M. J. 1992. The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca²⁺ spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. J. Biol. Chem. 267 : 25 113—25 119.

Brini M., Bano D., Manni S., Rizzuto R., Carafoli E. 2000. Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca(2+) signalling. EMBO J. 19 : 4926—4935.

Bronnikov G., Dolgacheva L., Zhang S. J., Galitovskaya E., Kramarova L., Zinchenko V. 1997. The effect of neuropeptides kyotorphin and nekyotorphin on proliferation of cultured brown preadipocytes. FEBS Lett. 407 : 73—77.

Bronnikov G., Houstek J., Nedergaard J. 1992. Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta but not via beta3 adrenoceptors. J. Biol. Chem. 267 : 2006—2013.

Bronnikov G. E., Zhang S. J., Cannon B., Nedergaard J. 1999. A dual component analysis explains the distinctive kinetics of cAMP accumulation in brown adipocytes. J. Biol. Chem. 274 : 37 770—37 780.

Cannon B., Rehnmark S., Nechad M., Herron D., Nedergaard J. 1990. Adrenergic regulation of gene expression in brown adipose tissue. In: Progress in obesity research. Oomura Y. et al. (Eds). John Libbey. 247—254.

Chen L., Harada N., Yamashita T. 1998. Thimerosal-induced Ca²⁺ mobilization in isolated guinea pig cochlear outer hair cells. Acta Otolaryngol. Suppl. 539 : 28—33.

Connolly E., Nedergaard J. 1988. Beta-adrenergic modulation of Ca²⁺ uptake by isolated brown adipocytes. Possible involvement of mitochondria. J. Biol. Chem. 263 : 10 574—10 582.

Connolly E., Nenberg E., Nedergaard J. 1984. Mobilization of Ca²⁺ in brown adipocytes in response to α_1 -adrenergic stimulation: dependence upon extracellular Na⁺ ions. Cell Calcium. 5 : 284—289.

Dolgacheva L. P., Abjalelov B. B., Zhang S.-J., Zinchenko V. P., Bronnikov G. E. 2003. Norepinephrine induces slow calcium signalling in murine brown preadipocytes through the beta-adrenoceptor/cAMP/protein kinase A pathway. Cell. Signal. 15 : 209—216.

Gessner K. 1551. Conradi Gesneri medici Tigurine Historiae Animalium: Lib. I De Quadrupedibus viviparis.

Guerini D., Zecca-Mazza A., Carafoli E. 2000. Single amino acid mutations in transmembrane domain 5 confer to the plasma membrane Ca²⁺ pump properties typical of the Ca²⁺ pump of endo(sarco)plasmic reticulum. J. Biol. Chem. 275 : 31 361—31 368.

Gukovskaya A. S., Trepakova E. S., Zinchenko V. P., Korystov Yu. N., Bezuglov V. V. 1992. Effect of sulfhydryl reagent thimerosal on cytosolic free Ca²⁺ and membrane potential of thymocytes. Biochim. biophys. acta. 111 : 65—74.

Gukovskaya A. S., Zinchenko V. P. 1990. Mechanisms of receptor mediated generation of ionic signals in rat thymocytes and Ehrlich ascites tumour cells. Phys. Chem. Biol. 10 : 1—98.

Missiaen L., Taylor C. W., Berridge M. J. 1991. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. Nature. 352 : 241—244.

Nagy H., Goda K., Fenyvesi F., Basco Z., Scilasi M., Szabo G. Jr. 2004. Distinct groups of multidrug resistance modulation agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. BBRC. 315 : 942—949.

Nanberg E., Putney J. 1986. Alpha-adrenergic activation of brown adipocytes leads to an increased formation of inositol polyphosphates. FEBS Lett. 195 : 319—322.

Nechad M., Kuusela P., Carneheim C., Björntorp P., Nedergaard J., Cannon B. 1983. Development of brown fat cells in minilayer culture. Exp. Cell Res. 149 : 105—118.

Nedergaard J., Cannon B. 1984. Preferential utilization of brown adipose tissue lipids during arousal from hibernation in hamsters. Amer. J. Physiol. 247 (3, Pt 2) : 506—512.

Nedergaard J., Mohell N., Nenberg E., Connolly E., Raasmaja A., Henschen L. 1986. α_1 -Adrenergic pathways in brown adipose tissue: mode of action and recruitment pattern. In: Living in the cold. Heller H. C. (Ed.). New York: Elsevier. 83—91.

Puigserver P., Pico C., Stock M. J., Palou A. 1996. Effect of selective beta-adrenoceptor stimulation on UCP synthesis in primary cultures of brown adipocytes. Mol. Cell. Endocrinol. 117 : 7—16.

Rasmussen A. T. 1923. The «so-called» hibernating glands. J. Morphol. 38 : 147—205.

Smith R. E. 1961. Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat. Physiologist. 4 : 113.

Smith R. E., Hock R. J. 1963. Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. Science. 140 : 199—200.

Thastrup O., Cullen P. J., Drobak B. K., Hanley M. R., Dawson A. P. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87 : 2466—2470.

Valladares A., Porras A., Alvarez A. M., Roncero C., Benito M. 2000. Noradrenaline induces brown adipocytes cell growth via beta-receptors by a mechanism dependent on ERKs but independent of cAMP and PKA. J. Cell. Physiol. 185 : 324—330.

Zhang S.-J. 1999. Regulation of intracellular calcium in brown adipocytes. Doctoral Thesis. Stockholm University.

Поступила 25 XI 2006

COMPARATIVE ANALYSIS OF Ca²⁺-SIGNALLING IN BROWN PREADIPOCYTES OF GROUND SQUIRREL *SPERMOPHILLUS UNDULATUS* AND MOUSE

L. P. Dolgacheva,¹ M. V. Konakov, T. A. Agafonova, V. V. Rybina, V. P. Zinchenko, G. E. Bronnikov

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region; ¹ mail: dolgacheva@mail.ru

Analysis of the slow Ca²⁺-responses of brown preadipocytes of ground squirrel *Spermophilus undulatus* and mouse was carried out. The mouse brown preadipocytes demonstrated low but prominent responses to noradrenalin with the maximum at 3 and 10 μ M being the less effective. The ground squirrel brown preadipocytes

practically did not practically respond to 10 nM—10 μ M, whereas 30—600 μ M noradrenalin was able to raise intracellular $[Ca^{2+}]_i$ up to 600 nM with 300 μ M agonist being the most effective. Stimulation of the plasma membrane Ca^{2+} -channels with thimerosal showed considerable reduction of the calcium entry system in the cell precursors of both species comparing with their mature adipocytes. Intracellular calcium stores liberated in preadipocytes of both species by tapsigargin and ionomycin in Ca^{2+} -free medium were insignificant, and capacitative Ca^{2+} -entry in response to the cellular Ca^{2+} -stores depletion was completely absent in Ca^{2+} -containing medium. The Ca^{2+} -responses of the ground squirrel brown preadipocytes were independent on physiological state of the animals and annual seasons. Preadipocytes of both species showed the same dose-response curves for the Ca^{2+} -raise under thimerosal, and the mouse had two-fold higher kinetic constants for the Ca^{2+} ions entry. The ground squirrel brown adipocytes responded to ionomycin with $\sim 25\%$ higher increase in $[Ca^{2+}]_i$ and the entry of the ions had 7—10-fold higher kinetic constants for this process. Kinetic constants for the $[Ca^{2+}]_i$ raise in mouse preadipocytes were independent of ionomycin concentration, whereas in the ground squirrel brown preadipocytes the constant linearly increased with the ionophore concentration. It is suggested that the found difference in the function of Ca^{2+} -signalling in preadipocytes of two species, which becomes apparent in the presence of ionomycin, might be responsible for the observed difference in the noradrenalin induced cellular Ca^{2+} -responses as well.

Key words: brown preadipocytes, noradrenalin, acclimation to cold, hibernation, Ca^{2+} -signaling system.
