

ИЗМЕНЕНИЕ Ca^{2+} -ОТВЕТОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ БУРЫХ АДИПОЦИТОВ ПРИ АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ

© Е. А. Туровский, М. В. Конаков, А. В. Бережнов, В. П. Зинченко,
Г. Е. Бронников, Л. П. Долгачева

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.;
электронный адрес: Dolgacheva@mail.ru

Термогенная способность бурой жировой ткани находится под контролем норадреналина. Норадреналин (НА), взаимодействуя с α - и β -адренорецепторами адипоцитов, вызывает увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) и сAMP. Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ под действием НА и селективных агонистов α 1- и β -адренорецепторов циразолина и изопротеренола (ИП) зарегистрированы на одиночных клетках первичной культуры адипоцитов в 1-е, на 3-и и 6-е сут культивирования. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ под действием ИП по сравнению с ответом на циразолин в клетках 1-х сут культивирования характеризуется большей амплитудой и меньшей длительностью импульса во всем диапазоне используемых физиологических концентраций. Через 3 сут эти различия незначительны, через 6 сут культивирования различия в кинетике практически отсутствуют. Для всех трех агонистов кинетика изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в пролиферирующих и дифференцированных клетках существенно различается: с возрастом культуры амплитуда ответа увеличивается, длительность транзиторного ответа при полумаксимальной амплитуде уменьшается и увеличивается чувствительность к агонистам адренорецепторов. По увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при действии ингибитора Ca^{2+} -ATРазы эндоплазматического ретикулума тапсигаргина в бескальциевой среде показано, что запас ионов кальция в эндоплазматическом ретикулуме увеличивается по мере роста и развития клеток в культуре, а скорость откачки Ca^{2+} из клеток, характеризующая активность Ca^{2+} -ATРазы плазматической мембранны, возрастает.

Ключевые слова: бурые преадипоциты, адренергические рецепторы, внутриклеточный Ca^{2+} , первичная культура.

Принятые сокращения: БЖТ — бурая жировая ткань, ИП — изопротеринол, НА — норадреналин, ТГ — тапсигаргин.

Бурая жировая ткань (БЖТ) является единственной тканью, осуществляющей несократительный термогенез (Nicholls, Locke, 1984; Cannon, Nedergaard, 2004). Активация теплопродукции находится под контролем норадреналина (НА), высвобождающегося из окончаний симпатических нервных волокон под действием холода (Jansky, 1973; Foster, Frydman, 1979; Bukowiecki et al., 1982; Astrup et al., 1985; Golozoubova et al., 2001; Klingenspor, 2003; Cannon, Nedergaard, 2004). Производство теплопродукции осуществляют митохондрии, которых в зрелых бурых адипоцитах, как и в кардиомиоцитах, огромное количество (Cannon, Nedergaard, 2008).

В отличие от клеток сердца, митохондрии которых генерируют чрезвычайно большое количество АТР, необходимое для постоянных сердечных сокращений, в митохондриях бурых адипоцитов происходит разобщение процессов окисления и фосфорилирования, что приводит к генерации тепла. Разобщающий белок (UCP1), расположенный на внутренней мемbrane митохондрий, катализирует этот процесс, обеспечивая транспорт протонов из межмембранныго пространства в матрикс (Klingenberg, 1999). Падение мембранныго потенциала обеспечивает высокие скорости митохондриального электронного транспорта, которое происходит в основном за счет окис-

ления липидов, запасенных в бурых адипоцитах (Kozak et al., 1988). Эффективность распределения производимого тепла достигается не только за счет расположения БЖТ вблизи важных кровеносных сосудов, но и за счет большого количества сосудов и мелких капилляров в самой ткани.

Увеличение термогенной способности обеспечивается также за счет пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток бурого жира. Ионы кальция являются основным вторичным мессенджером в регуляции этих фундаментальных биологических процессов. Свежевыделенные прогениторные клетки бурого жира обладают оригинальной системой кальциевой сигнализации, так как в отличие от зрелых клеток фосфоинозитидный путь в преадипоцитах играет незначительную роль в увеличении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ под действием агонистов α -адренорецепторов. Главенствующую роль в формировании кальциевого сигнала под действием НА играет аденилатциклазный путь, активируемый агонистами β -адренорецепторов (Долгачева и др., 2000, 2002). В процессе развития и дифференцировки адипоцитов меняются структура клетки, состав, количество и свойства адренорецепторов и ферментов внутриклеточной сигнализации, что приводит к изменению физиологического ответа клетки на действие НА.

В работе стояли следующие задачи: установить закономерности изменения Ca^{2+} -ответов в процессе роста бурых адипоцитов в первичной культуре при адренергической стимуляции, выяснить роль $\alpha 1$ - и β -адренорецепторов в формировании кальциевого ответа на действие НА, а также оценить изменения кальциевого пула в эндоплазматическом ретикулуме адипоцитов в процессе их культивирования через 1, 3 и 6 сут.

Материал и методика

Мышей-самцов линии NMRI в возрасте 3—5 нед содержали в отсутствие холодового стресса при 23—25 °C. Для культивирования использовали свежевыделенную суспензию клеток-предшественников бурого жира или преадипоцитов (Bronnikov et al., 1992).

Выделение преадипоцитов. Все операции проходили в стерильных условиях на льду. Дезинфекцию животных перед вскрытием осуществляли 70%-ным этанолом. Забор БЖТ производили из межлопаточной области. Кусочки ткани помещали в чашку Петри, содержащую 2 мл охлажденной среды DMEM, очищали от белой жировой ткани, соединительной ткани и крови, затем тщательно измельчали с помощью ножниц и переносили в пробирки со средой DMEM (20 мл), содержащей бычий сывороточный альбумин (BSA, 3 %) и коллагеназу (200 U/мл), pH 7.4, при 37 °C. Препарат инкубировали в течение 20 мин на водяной бане при 37 °C, встряхивая смесь каждые 5 мин на вортексе, а затем охлаждали на льду в течение 15—30 мин. После этого верхний слой, состоящий преимущественно из жировых капель и зрелых адипоцитов, удаляли шприцем с толстой иглой. Оставшуюся суспензию клеток фильтровали на нейлоновом фильтре (с размером пор 250 мкм) и центрифугировали при 2700 об/мин в течение 10 мин на центрифуге K-23 (MLW, Германия). После центрифugирования слой белого жира удаляли, супернатант отбирали шприцем с длинной иглой, а полученный осадок ресуспендировали в среде DMEM (9 мл на г ткани) с добавлением 10 mM HEPES и BSA (0.5 мг/мл), pH 7.4, отфильтровывали на нейлоновом фильтре (с размером пор 25 мкм) и центрифугировали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в среде для культивирования. Полученная суспензия содержала молодые преадипоциты, так как зрелые адипоциты содержат жировые капли и не осаждаются при данных условиях центрифugирования.

Культивирование адипоцитов. Клетки (300 тыс.) сеяли на покровные круглые стекла (диаметром 25 мм), которые помещали в чашки Петри (35 мм, объем среды 500 мкл) и оставляли на 8 ч в CO_2 -инкубаторе для прикрепления клеток. После этого объем среды культивирования доводили до 1 мл. Клетки выращивали при 37 °C, 8 % CO_2 и 100%-ном насыщении атмосферы водяными парами.

Использовали стерильную среду DMEM (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), 4 mM L-глутамина, 4 нМ инсулина, 50 IU/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл аскорбата Na (Sigma).

Для визуализации жировых включений использовали краситель Oil Red (Fasshauer et al., 2000; Zhang et al., 2006). С этой целью культуру клеток перевели в фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Далее клетки фиксировали 10%-ным формалином в течение 1 ч,

окрашивали красителем Oil Red (0.3 % в 60%-ном изопропаноле, 1 ч), отмывали от красителя с помощью PBS и высушивали при 37 °C в сушильном шкафу. Фотосъемку клеток проводили с помощью установки Cell observer (Carl Zeiss, Германия) с высокоскоростной черно-белой CCD-камерой AxioCam HSm и объективом Plan Neofluar 40 \times /0.3. На каждом из 5 стекол выбирали 10 произвольных областей. Полученные изображения в формате zvi использовали для дальнейшей компьютерной обработки с помощью программы ImageJ с плагином Analyze Particles.

Измерение концентрации Ca^{2+} в цитозоле осуществляли методом флуоресцентной микроскопии с помощью флуоресцентного зонда Fura-2/AM (Grynkiewicz et al., 1985). Клетки нагружали зондом в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), содержащем 10 mM HEPES, pH 7.4, при 37 °C в течение 40 мин с последующей отмыvkой от красителя в течение 15 мин.

Для регистрации кальциевых сигналов использовали установку Cell observer (Carl Zeiss, Германия) с высокоскоростной черно-белой CCD-камерой AxioCam HSm. Источником света служила ртутная лампа HBO 100. Возбуждение флуоресценции Fura-2 проводили при двух длинах волн (340 и 387 нм) с использованием запирающих светофильтров BP 340/30 и BP 387/15, регистрировали в области 465—555 нм (светофильтр BP 510/90). С целью предупреждения фотодеструкции зонда использовали 50 % мощности ртутной лампы и нейтральные фильтры (25 и 5 %). Использовали объектив Plan Neofluar 40 \times /0.3. Серии цифровых изображений, полученных с интервалом в 5 с, обрабатывали в программе ImageJ с использованием плагинов Time Series Analyzer и RatioPlus. Построение графиков осуществляли с помощью программы Origin.

Результаты

Известно, что при использовании стандартной среды культивирования с добавлением 5 нМ инсулина и 10 % сыворотки новорожденных телят бурые адипоциты мыши в течение 4 сут активно пролиферируют, на 5-е сут культура становится преконфлюэнтной. В результате контактного торможения активизируется процесс дифференцировки клеток, сопровождающийся усилением накопления жировых капель и экспрессией разобщающего белка UCP1. На 6-е сут клетки образуют монослой и становятся дифференцированными (Bronnikov et al., 1992).

На рис. 1 показана первичная культура клеток БЖТ через 1, 3 и 6 сут после посева преадипоцитов. В 1-суточной культуре приблизительно 5 % клеток были большего размера. Для устранения загрязнения культуры фибробластами добавляли ингибитор их роста — цитозин арабинозид в концентрации 10 нМ.

Важным морфологическим отличием зрелых бурых адипоцитов от других клеток является образование множественных жировых капель. Контрастировать жировые включения или капли можно с помощью красителя Oil Red. В 1-е сут клетки не содержат жировых капель и имеют малый размер. Типичная клетка показана на рис. 2, а. На 3-и сут культивирования количество клеток возрастает вследствие активной пролиферации, их размер увеличивается, и появляются клетки с жировыми включениями. Типичная клетка показана на рис. 1, б. На 6-е сут видны зрелые адипоциты большого размера с многочисленными

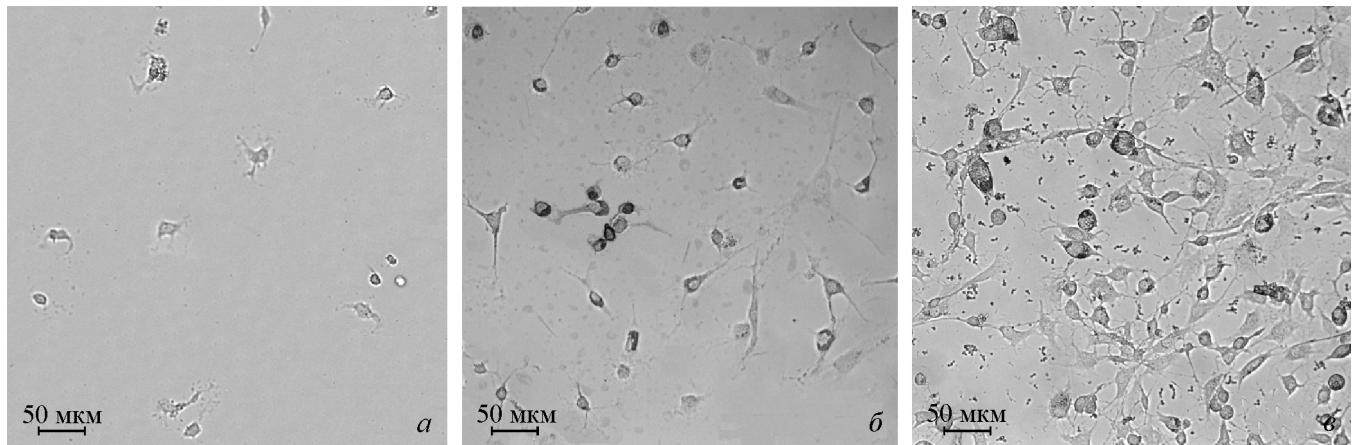


Рис. 1. Первичная культура бурых адипоцитов через 1 (а), 3 (б) и 6 (в) сут после посева.
Проходящий свет, об. 10×.

жировыми включениями (рис. 1, в), которые занимают не менее 80 % поля зрения.

Известно, что активация адипоцитов происходит вследствие взаимодействия НА с α 1- и β -адренорецепторами и сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Для определения вклада α 1- и β -адренорецепторов в увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в первичной культуре бурых адипоцитов под действием НА и оценки пула Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) мы выбрали три фазы при культивировании клеток: 1-е сут, когда клетки имеют наибольшее сходство с прогениторными клетками; 3-и сут, когда клетки обладают самым высоким уровнем пролиферации; 6-е сут, когда клетки уже стали дифференцированными.

Клетки 1-суточной культуры отвечают на действие НА небольшими изменениями $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3), но в отличие от Ca^{2+} -ответа свежевыделенных прогениторных клеток (Долгачева и др., 1999) этот ответ является транзиторным, в нем отсутствует лаг-период, скорость роста $[Ca^{2+}]_i$ увеличена в 8–10 раз. Длительность транзиторного ответа, измеренная при полумаксимальной амплитуде, составляет 100–220 с при действии НА в концентрации от 0.3 до 10 мкМ. Эти концентрации являются физиологическими (Bukowiecki et al., 1982; Bronnikov et al., 1992, 1999;

Tuchiya, Nagai, 1994; Dolgacheva et al., 2003) и активируют в клетках бурого жира процессы пролиферации и дифференцировки, синтез разобщающего белка UCP1 и термогенез. Максимальный кальциевый ответ для клеток 1-суточной культуры был зарегистрирован при 10 мкМ НА (рис. 3).

Амплитуда изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках через 3 сут после посева увеличилась в 1.7–4 раза по сравнению с 1-суточными клетками, а длительность транзиторного ответа почти не изменилась — 100–200 с. Несколько увеличились скорость роста $[Ca^{2+}]_i$ и скорость откачки кальция из цитозоля. Кроме того, увеличилась чувствительность клеток к нейротрансмиттеру НА — максимальный ответ для клеток через 1 сут после посева зарегистрирован при 10 мкМ НА, тогда как максимальный ответ для клеток, культивируемых 3 сут, зарегистрирован при 3 мкМ НА.

По истечении 6 сут почти все адипоциты стали дифференцированными клетками с многочисленными жировыми включениями (рис. 1, в), готовыми выполнить свою основную термогенную функцию. Максимальная амплитуда кальциевого ответа на действие НА (рис. 3) этих адипоцитов увеличилась более чем в 2 раза по сравнению с клетками, культивируемыми 3 сут, а длительность транзиторного ответа при полумаксимальной амплитуде

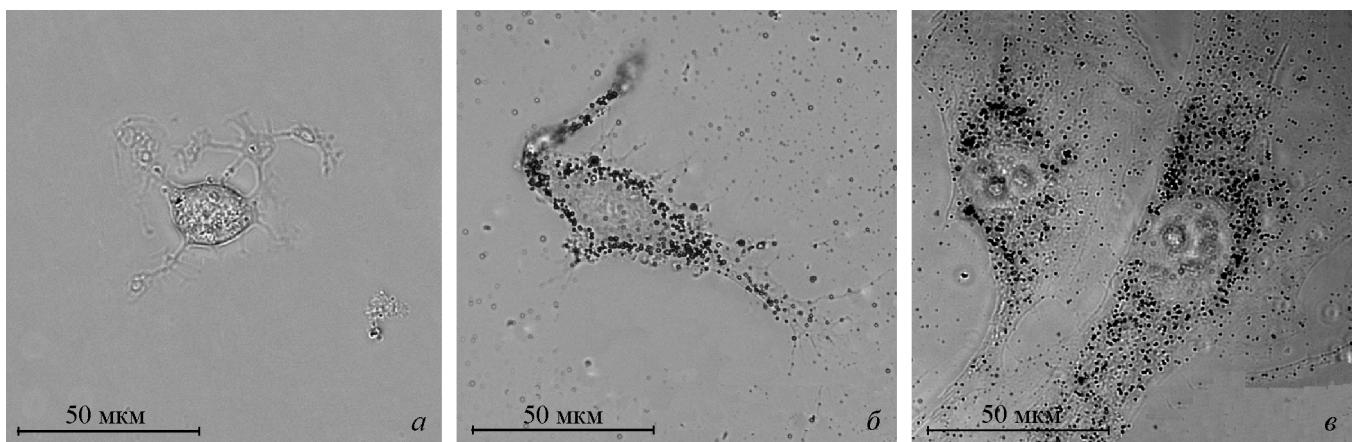


Рис. 2. Изменение морфологии клеток бурой жировой ткани в процессе культивирования. Первичная культура.

Локализация жировых капель в клетках через 1 (а), 3 (б) и 6 (в) сут культивирования, выявленная с помощью красителя Oil Red. Проходящий свет, об. 10×.

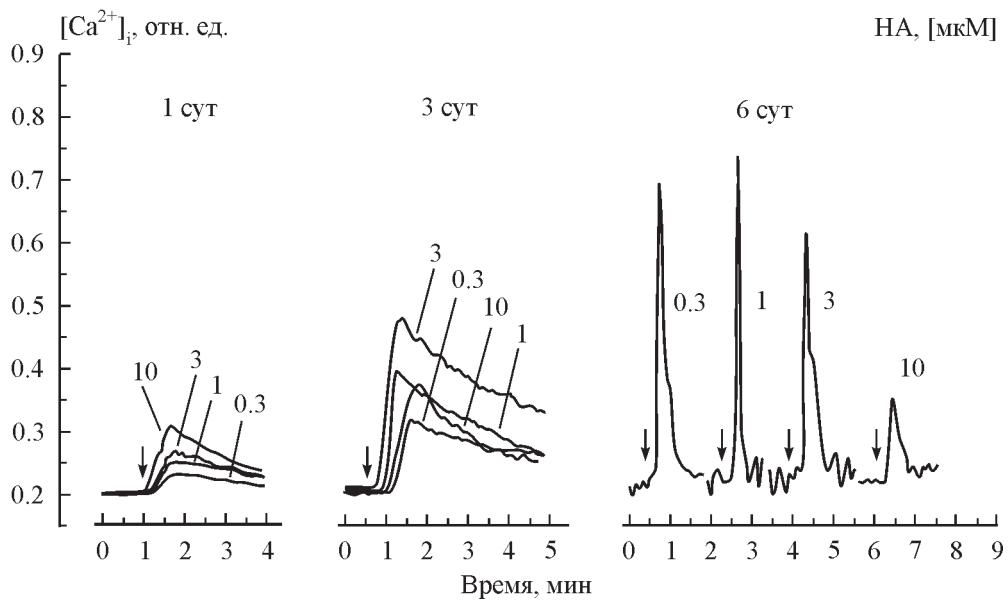


Рис. 3. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле бурых адипоцитов под действием норадреналина (НА, 0.3—10 мкМ) через 1, 3 и 6 сут культивирования.

По оси ординат — отношение флуоресценции Fura-2 при возбуждении светом в длинах волн 340 и 380 нм; стрелкой указан момент добавления НА. Числа у кривых указывают концентрацию НА. Здесь и далее: каждая кривая представляет собой усредненный ответ от 10—20 клеток для 1-суточной культуры, от 20—40 клеток для 3-суточной и от 50—70 клеток для 6-суточной культуры.

де уменьшилась в 10 раз и составила 10—20 с. На дифференцированных клетках более выражено подавление кальциевого сигнала при увеличении концентрации НА, что указывает на включение отрицательной обратной связи.

Таким образом, кальциевый ответ на действие НА (рис. 3) дифференцированных адипоцитов существенно отличается от ответа пролиферирующих клеток как по амплитуде, так и по длительности импульса, скоростям роста и снижения концентрации кальция в цитозоле. Анализируя ответы адипоцитов через 1, 3 и 6 сут культивирования, следует отметить, что по мере дифференцировки адипоцитов возрастает не только активность Ca^{2+} -мобилизующих систем (кальциевых каналов) и увеличивается их чувствительность к НА, но и активируются системы активной откачки ионов кальция из цитозоля.

Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле при активации клеток определяется и управляет выбросом ионов кальция из ЭР. Для оценки внутриклеточных запасов кальция обычно используют селективный ингибитор Ca^{2+} -АТФазы ЭР тапсигаргин (Thastrup et al., 1990). На рис. 4 показаны изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в адипоцитах через 1, 3 и 6 сут культивирования при опустошении ЭР в бескальциевой среде под действием тапсигаргина. Амплитуда сигнала в этих условиях пропорциональна запасам кальция в ЭР, а скорость уменьшения сигнала отражает активность кальциевой АТРазы плазматической мембрany (PMCA).

Как следует из данных рис. 4, внутриклеточный запас ионов кальция самый маленький в молодых клетках (1-е сут). В процессе пролиферации и дальнейшего развития и дифференцировки этот запас значительно увеличивается. Увеличивается и скорость откачки ионов Ca^{2+} из клеток.

Ранее нами было показано, что в свежевыделенных преадипоцитах β -адренорецепторы вносят больший вклад в генерацию Ca^{2+} -сигнала, чем $\alpha 1$ -адренорецепторы (Dolgacheva et al., 2003). Для выяснения вопроса о том, какие

типы адренорецепторов ответственны за генерацию $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при действии НА и как меняется вклад этих рецепторов в процессе роста и развития клеток в культуре, мы использовали селективные агонисты β - и $\alpha 1$ -адренорецепторов изопротеренол (ИП) и циразолин соответственно.

На рис. 5 и 6 показаны изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках под действием ИП и циразолина через 1, 3 и 6 сут в культуре. Оба агента вызывают повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Небольшой по амплитуде и длительный кальциевый ответ через 1 сут по мере роста и дифференцировки клеток превращается в кратковременный, импульсный с большой амплитудой через 6 сут культивирования. Как видно на рис. 5 и 6, из-

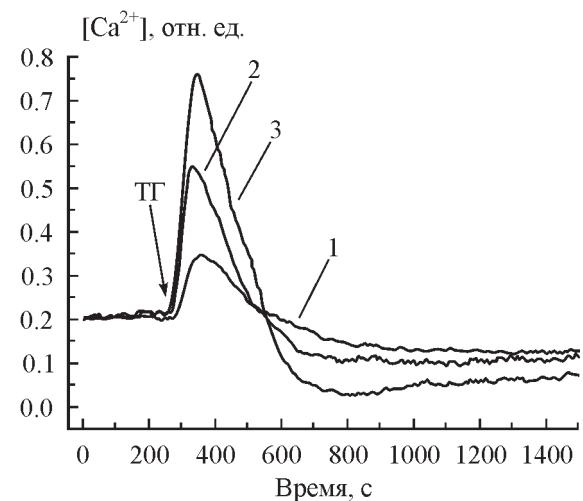


Рис. 4. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в культивируемых адипоцитах под действием 0.5 мкМ тапсигаргина (ТГ) в бескальциевой среде. 1—3 — клетки 1-, 3- и 6-суточной культуры соответственно; стрелкой указан момент добавления ТГ.

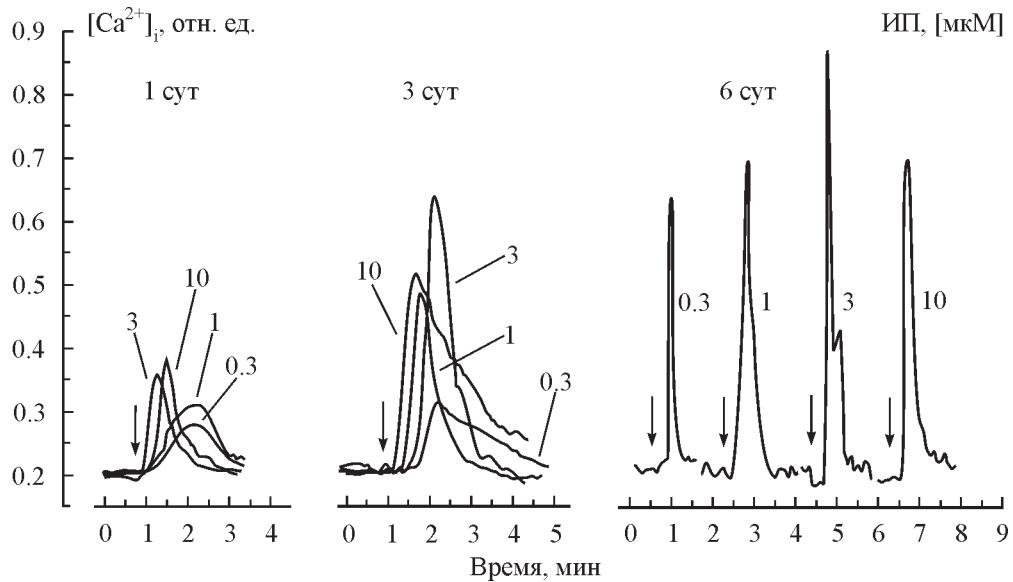


Рис. 5. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ в культивируемых адипоцитах через 1, 3 и 6 сут после посева под действием изопротеренола (ИП) в концентрации 0.3, 1, 3 или 10 мкМ.

Числа у кривых указывают концентрацию агента, стрелкой указан момент его добавления.

менение $[Ca^{2+}]_i$ под действием ИП по сравнению с изменением при действии циразолина в клетках через 1 сут культивирования характеризуется большей амплитудой и меньшей длительностью импульса во всем диапазоне используемых физиологических концентраций. Через 3 сут культивирования амплитуды $[Ca^{2+}]_i$ под действием ИП и циразолина различаются мало. Длительность импульсов, измеренная при полумаксимальной амплитуде, несколько меньше в случае ИП (20—140 с), чем в случае циразолина (110—200 с). Через 6 сут культивирования ответы на оба агониста превращаются в импульсные. В случае циразолина выявляется подавление кальциевого сигнала при увеличении концентрации агониста, тогда как в случае ИП этого эффекта не наблюдается. Другие различия в ки-

нетике практически отсутствуют, что означает равноправное участие каждого из путей в формировании кальциевого сигнала под действием природного нейротрансмиттера норадреналина.

Обсуждение

Ca^{2+} -сигнальная система клеток бурого жира изучена недостаточно, но более 20 лет назад было показано, что активация $\alpha 1$ -адреноэргических рецепторов вызывает гидролиз фосфоинозитидов (Mohell et al., 1984; Nanberg, Putney, 1986). Позже на бурых адипоцитах показали, что кинетика изменения $[Ca^{2+}]_i$ под действием НА — главного

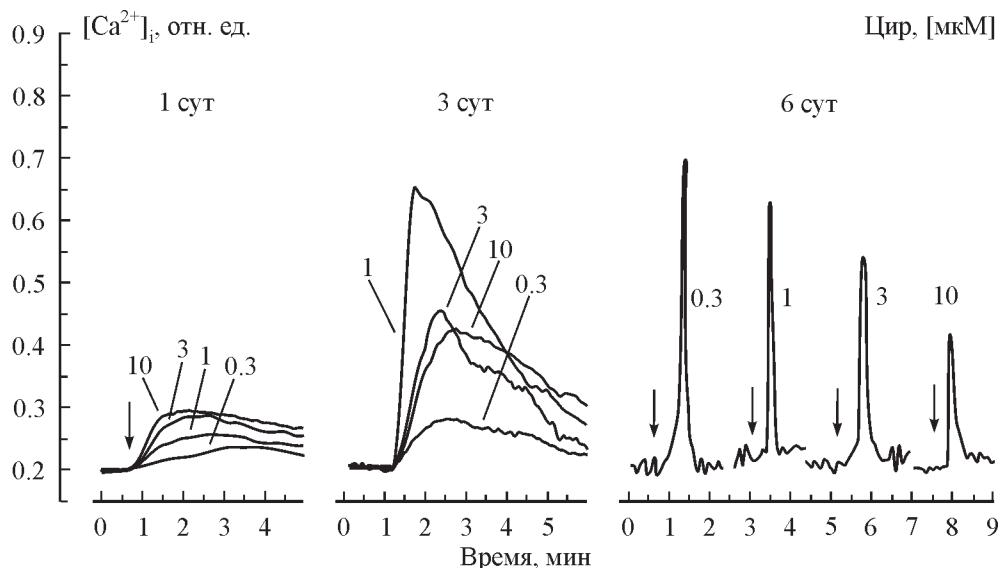


Рис. 6. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ в культивируемых адипоцитах через 1, 3 и 6 сут после посева под действием циразолина (Цир) в концентрации 0.3, 1, 3 или 10 мкМ.

Обозначения те же, что и на рис. 5.

нейротрансмиттера термогенеза — выглядит типичной для метаботропных рецепторов невозбудимых клеток (Wilcke, Nedergaard, 1989; Thonberg et al., 1994). В этих работах были сделаны выводы о том, что увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в адипоцитах, как и в других невозбудимых клетках, опосредовано $\alpha 1$ -адренорецепторами, но уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ позитивно регулируются цАМФ-зависимыми процессами. В той же лаборатории (Thonberg et al., 1994) была подтверждена фундаментальная роль НА в контроле за ростом и развитием клеток бурого жира по его способности инициировать экспрессию *c-fos*, опосредованную синергизмом сигнальных путей от β -адренорецепторов через цАМФ и от $\alpha 1$ -адренорецепторов через $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Первые исследования Ca^{2+} -сигнальной системы молодых клеток — преадипоцитов — были опубликованы в 1994 г. (Tuchiya, Nagai, 1994). В этой работе показана кинетика увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в одиночных бурых преадипоцитах крысы под действием НА. Эта кинетика значительно отличалась от ответа зрелой клетки и по амплитуде, и по отсутствию транзиторного сигнала. Позже были опубликованы более подробные результаты, из которых следовало, что увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в суспензии преадипоцитов мыши под действием НА начинается лишь после 5-минутной лаг-фазы, ответ развивается очень медленно ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i = 0.03 \text{ нМ/с}$), и его величина едва достигает 100—150 нМ за 20 мин (Bronnikov et al., 1997; Долгачева и др., 1999). В этих работах было показано, что запасы внутриклеточного Ca^{2+} в молодых клетках весьма незначительны и в них практически не функционирует механизм индукции входа Ca^{2+} в клетки снаружи, активированный выбросом Ca^{2+} из ЭР (Долгачева и др., 1999). В свежевыделенных преадипоцитах бурого жира мыши наряду с $\alpha 1$ -адренорецепторами в генерации Ca^{2+} -сигнала участвуют и β -адренорецепторы (Долгачева и др., 2000). Кроме того, изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, инициируемое β -адренорецепторами в ответ на добавление соответствующего агониста, имеет большую амплитуду, чем изменение, формируемое $\alpha 1$ -адренорецепторами. Более того, непосредственная активация аденилатциклазы форсколином или инкубация клеток с проникающим аналогом цАМФ (Br-цАМФ) приводила к росту $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до более высоких величин, чем добавка НА. Ингибитор протеинкиназы А Н-89 уменьшал, а ингибитор общей фосфодиэстеразы IBMX или ингибитор протеинфосфатаз окадаиковая кислота увеличивали кальциевые ответы на действие НА и ИП. Авторами был сделан вывод о том, что цАМФ и опосредованное протеинкиназой А фосфорилирование являются вторым путем активации кальциевой сигнализации при адренергической стимуляции бурых преадипоцитов (Долгачева и др., 2002).

В то же время появилась работа о повышении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в дифференцированных адипоцитах крысы при активации β -адренорецепторов (Leaver, Rappone, 2002). Авторы показали, что в бурых адипоцитах крысы цАМФ активирует выход ионов кальция из IP_3 -чувствительного пула и ИП в концентрации 10 мкМ незначительно активирует $\alpha 1$ -адренорецепторы. С помощью антагонистов α -адренорецепторов показано, что β -адренергический компонент ИП является важным фактором, причастным к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Leaver, Rappone, 2002). Активация IP_3 -опосредованного Ca^{2+} -выхода при увеличении цАМФ установлена также на гепатоцитах (Burgess et al., 1991; Schofl et al., 1991; Somogyi et al., 1992; Hajnoczky et al., 1993), панкреатических клетках (Liu et al., 1996) и суставных хондроцитах (D'Andrea et al., 1996).

В данной работе представлены кинетики изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в культивируемых бурых адипоцитах под действием природного нейротрансмиттера НА и агонистов $\alpha 1$ - и β -адренорецепторов (циразолина и ИП соответственно). Под действием каждого из указанных агонистов в процессе роста и развития клеток в культуре происходят увеличение амплитуды $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и уменьшение длительности транзиторного ответа.

С помощью тапсигаргина мы показали, что запас Ca^{2+} в ЭР увеличивается по мере пролиферации и дифференцировки клеток, и это может объяснить рост амплитуды сигнала у дифференцированных адипоцитов. Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызванное активатором аденилатциклазного пути ИП, несколько превышает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ под действием НА и циразолина, что свидетельствует о наличии отрицательной обратной связи, особенно проявляющейся при активации $\alpha 1$ -адренорецепторов агонистом (НА, циразолином) в большой концентрации.

Известно несколько молекулярных механизмов отрицательной обратной связи, которые могли бы объяснить наблюдаемый эффект: уменьшение уровня цАМФ вследствие активации Ca^{2+} -зависимых фосфодиэстераз или десенситизацией β -адренорецепторов (Leaver, Rappone, 2002); наличие второго места связывания агониста (Mollenar et al., 2007); изменяющаяся в процессе развития гетерогенность связывающих сайтов (Maksay, 1996); десенситизация рецепторов под действием протеинкиназ (Tertyshnikova, Fein, 1998) и другие эффекты взаимодействия сигнальных путей (Kurosaki, 1997; Bronnikov et al., 1999; Dolgacheva et al., 2003). Следует отметить, что НА взаимодействует не только с $\alpha 1$ - и β -, но и с $\alpha 2$ -адренорецепторами, вызывая при этом активацию гетеротримерного белка G_i . Субъединицы $G_i\alpha\text{GTP}$ подавляют активность аденилатциклазы и синтез цАМФ, понижая тем самым долю вклада β -адренорецепторов в $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Marzo et al., 2009).

В последние несколько лет разные группы исследователей показали, что БЖТ присутствует не только у новорожденных людей, но и у взрослых (Ravussin, 2010). У взрослых людей с помощью FDG РЕ-томографии (fluorodeoxyglucose positron emission tomography) найдена локальная гиперметаболическая БЖТ в затылочной, надключичной, околопозвоночной, медиастиальной, параортальной и надпочечной областях (Truong et al., 2004; Cannon, Nedergaard, 2010). Установлена онтогенетическая взаимосвязь между БЖТ и скелетной мускулатурой (Seale et al., 2008). Авторы показали, что бурые жировые клетки (но не белые жировые) образуются из предшественников, которые экспрессируют ген *tuf5*, характерный для миогенных линий, и что регулятор транскрипции PRDM16 контролирует двунаправленное метаболическое переключение клетки между скелетными миобластами и клетками бурого жира. Эти открытия вновь акцентируют внимание на том, что БЖТ вносит вклад в энергетический баланс человека и может быть терапевтической мишенью в борьбе с ожирением, связанным с метаболическими нарушениями (Cannon, Nedergaard, 2009; Nedergaard, Cannon, 2010). Одна из стратегий борьбы с ожирением предполагает преобразование белой жировой ткани в бурую (Langin, 2010). Авторы идентифицировали механизм, с помощью которого показали, что PRDM16 — основной регулятор формирования и функционирования бурых адипоцитов — может одновременно индуцировать экспрессию генов БЖТ и подавлять экспрессию генов белой жировой ткани (Kajimura et al., 2008).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01306).

Список литературы

- Dolgacheva L. P., Abjalelov B. B., Baumuratos A. C., Zinchenko V. P., Bronnikov G. E. 2002. Аденилаткиназный путь участвует в регуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} в преадипоцитах бурого жира. Цитология. 44 (1) : 56—61.
- Dolgacheva L. P., Galitovskaya E. N., Baumuratos A. C., Zinchenko V. P., Bronnikov G. E. 2000. В генерации Ca^{2+} -ответа на норадреналин в бурых преадипоцитах мыши участвуют как α_1 -, так и β -адренорецепторы. Цитология. 42 (12) : 1154—1158.
- Dolgacheva L. P., Galitovskaya E. N., Zinchenko V. P., Bronnikov G. E. 1999. Редуцирование Ca^{2+} -транспортирующих систем в молодых клетках бурого жира мыши. Биол. мембранны. 16 (4) : 410—415.
- Astrup A., Bülow J., Madsen J., Christensen N. 1985. Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by epinephrine in man. Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 248 : E507—E515.
- Bronnikov G. E., Dolgacheva L. P., Shi-Jin Zhang, Galitovskaya E. N., Kramarova L., Zinchenko V. P. 1997. The effect of neuropeptides kyotorphin and neokyotorphin 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 1 but not via beta 3 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 (53) : 37 770—37 780.
- Bukowiecki L. J., Collet A. J., Follea N., Guay G., Jahjah L. 1982. Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 242 : E353—E359.
- Burgess G. M., Bird G. S., Obie J. F., Putney J. W., Jr. 1991. The mechanism for synergism between phospholipase C- and adenylyl cyclase-linked hormones in liver. Cyclic AMP-dependent kinase augments inositol trisphosphate-mediated Ca^{2+} mobilization without increasing the cellular levels of inositol polyphosphates. J. Biol. Chem. 266 : 4772—4781.
- Cannon B., Nedergaard J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol. Rev. 84 : 277—359.
- Cannon B., Nedergaard J. 2008. Studies of thermogenesis and mitochondrial function in adipose tissues. Methods Mol. Biol. 456 : 109—121.
- Cannon B., Nedergaard J. 2009. Thermogenesis challenges the adipostat hypothesis for body-weight control. Proc. Nutr. Soc. 68 : 401—407.
- Cannon B., Nedergaard J. 2010. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). Int. J. Obes. (Lond.). 34 (Suppl. 1) : S7—S16.
- D'Andrea P., Paschini V., Vittur F. 1996. Dual mechanism for cAMP-dependent modulation of Ca^{2+} signalling in articular chondrocytes. Biochem. J. 318 : 569—573.
- 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.
- Fasshauer M., Klein J., Ueki K., Kriauciunas K. M., Benito M., White M. F., Kahn C. R. 2000. Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes. J. Biol. Chem. 275 : 25 494—25 501.
- Foster D. O., Frydman M. L. 1979. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by non-shivering thermogenesis. Can. J. Physiol. Pharmacol. 57 : 257—270.
- Golozoubova V., Hohtola E., Matthias A., Jacobsson A., Cannon B., Nedergaard J. 2001. Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. FASEB J. 15 : 2048—2050.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260 : 3440—3450.
- Hajnoczky G., Gao E., Nomura T., Hoek J. B., Thomas A. P. 1993. Multiple mechanisms by which protein kinase A potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} mobilization in permeabilized hepatocytes. Biochem. J. 293 : 413—422.
- Jansky L. 1973. Nonshivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. Biol. Rev. 48 : 85—132.
- Kajimura S., Seale P., Tomaru T., Erdjument-Bromage H., Cooper M. P., Ruas J. L., Chin S., Tempst P., Lazar M. A., Spiegelman B. M. 2008. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. Genes Develop. 22 : 1397—1409.
- Klingenberg M. 1999. Uncoupling protein — a useful energy dissipator. J. Bioenerg. Biomembr. 31 : 419—430.
- Klingenspor M. 2003. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. Exp. Physiol. 88 : 141—148.
- Kozak L. P., Britton J. H., Kozak U. C. 1988. The mitochondrial uncoupling protein gene. J. Biol. Chem. 263 : 12 274—12 277.
- Kurosaki F. 1997. Role of inward K^+ channel located at carrot plasma membrane in signal cross-talking of cAMP with Ca^{2+} cascade. FEBS Lett. 408 : 115—119.
- Langin D. 2010. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? Biochim. biophys. acta. 1801 (3) : 372—376.
- Leaver E. V., Pappone P. A. 2002. Adrenergic potentiation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} release in brown fat cells. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 282 : C1016—C1024.
- Liu Y. J., Grapengiesser E., Gylfe E., Hellman B. 1996. Cross-talk between the cAMP and inositol trisphosphate-signalling pathways in pancreatic β -cells. Arch. Biochem. Biophys. 334 : 295—302.
- Maksay G. 1996. From kinetics and thermodynamics of GABA receptor binding to ionophore function. Neurochem. Int. 29 : 361—370.
- Marzo A., Bai J., Otani S. 2009. Neuroplasticity regulation by noradrenaline in mammalian brain. Curr. Neuropharmacol. 7 : 286—295.
- Mohell N., Wallace M., Fain J. N. 1984. Alpha-adrenergic stimulation of phosphatidylinositol turnover and respiration of brown fat cells. Mol. Pharmacol. 25 : 64—69.
- Molenaar P., Chen L., Semmler A. B., Parsonage W. A., Kauermann A. J. 2007. Human heart beta-adrenoceptors: betal-adrenoceptor diversification through «affinity states» and polymorphism. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 34 : 1020—1028.
- Nanberg E., Putney J. Jr. 1986. Alpha Alpha1-adrenergic activation of brown adipocytes leads to an increased formation of inositol polyphosphates. FEBS Lett. 195 : 319—322.
- Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 293 : E444—E452.
- Nedergaard J., Cannon B. 2010. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. Cell Metab. 11 : 268—272.
- Nicholls D. G., Locke R. M. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. Physiol. Rev. 64 : 1—64.
- Ravussin E. 2010. The presence and role of brown fat in adult humans. Curr. Diab. Rep. 10 : 90—92.
- Schofl C., Sanchez-Bueno A., Brabant G., Cobbold P. H., Cuthbertson K. S. 1991. Frequency and amplitude enhancement of calcium transients by cyclic AMP in hepatocytes. Biochem. J. 273 : 799—802.

- Seale P., Bjork B., Yang W., Kajimura S., Kuang S., Scime A., Devarakonda S., Chin S., Conroe H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Rudnicki M., Beier D., Spiegelman B. M. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 454 : 961—967.
- Somogyi R., Zhao M., Stucki J. 1992. Modulation of cytosolic- $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations in hepatocytes results from cross-talk among second messengers. The synergism between the α_1 -adrenergic response, glucagon and cyclic AMP, and their antagonism by insulin and diacylglycerol manifest themselves in the control of the cytosolic- $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillations. *Biochem. J.* 286 : 869—877.
- Tertyshnikova S., Fein A. 1998. Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 95 : 1613—1617.
- Thastrup O., Cullen P. J., Drobak B. K., Hanley M. R., Dawson A. P. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 87 : 2466—2470.
- Thonberg H., Zhang S. J., Tvrđik P., Jacobsson A., Nedergaard J. 1994. Norepinephrine utilizes alpha 1- and beta-adrenoreceptors synergistically to maximally induce c-fos expression in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 269 : 33 179—33 186.
- Truong M. T., Erasmus J. J., Munden R. F., Marom E. M., Sabloff B. S., Gladish G. W., Podoloff D. A., Macapinlac H. A. 2004. Focal FDG uptake in mediastinal brown fat mimicking malignancy: a potential pitfall resolved on PET/CT. *AJR. Amer. J. Roentgenol.* 183 : 1127—1132.
- Tuchiya K., Nagai M. 1994. Increase in intracellular calcium in freshly-dispersed, single brown adipocytes of the rat by adrenergic stimulation. *Biomed. Res. (Tokyo)*. 15 : 347—355.
- Wilcke M., Nedergaard J. 1989. Alpha1- and beta-adrenergic regulation of intracellular Ca^{2+} -levels in brown adipocytes. *Biocem. Biophys. Res. Commun.* 163 : 292—300.
- Zhang L., Baker G., Janus D., Padden C. A., Fuhrer D., Ludgate M. 2006. Biological effects of thyrotropin receptor activation on human orbital preadipocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 : 5197—5203.

Поступила 1 III 2011

ALTERATION OF BROWN ADIPOCYTE Ca^{2+} RESPONSES IN CULTURE BY ADRENERGIC ACTIVATION

E. A. Turovsky, M. V. Konakov, A. V. Berezhnov, V. P. Zinchenko, G. E. Bronnikov, L. P. Dolgacheva

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region;
e-mail: Dolgacheva@mail.ru

Thermogenic capability of brown adipose tissue is controlled by norepinephrine. Interaction of norepinephrine with adipocyte α_1 - and β -adrenergic receptors results in the increase of Ca^{2+} and cAMP concentrations. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes initiated by norepinephrine and selective agonists of α_1 - and β -adrenergic receptors, cirazolin and isoproterenol, were recorded in single cells of primary culture on the 1st, 3rd and 6th days *in vitro*. On the first day, isoproterenol-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes as compared to cirazolin-induced ones were characterized by greater amplitude and lesser impulse duration over the entire range of physiological concentrations used. These differences were negligible after 3 days and kinetic differences were practically absent after 6 days of cultivation. The agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes in proliferating and differentiated cells differed significantly: in the process of cell growth in culture, the amplitude of calcium response increased, the duration of impulse signal decreased and the sensitivity to adrenergic agonists increased. The Ca^{2+} store in endoplasmic reticulum increased during the cell growth and development in culture, according to thapsigargin-induced Ca^{2+} response amplitude increase in Ca^{2+} free medium. The rate of Ca^{2+} pumping out of cell characterizing PMCA-activity also increased.

Key words: brown preadipocytes, adrenergic receptors, intracellular Ca^{2+} , primary culture.