

УДК 577.352.4

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ АДИПОЦИТОВ МЫШИ К НОРАДРЕНАЛИНУ ПРИ ОЖИРЕНИИ И ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

¹Туровский Е.А., ¹Туровская М.В., ¹Толмачева А.В., ¹Долгачева Л.П.,
¹Зинченко В.П., ^{1,2}Дынный В.В.

¹Учреждение Российской академии наук «Институт биофизики клетки»,
Пуццо, e-mail: turovsky.84@mail.ru;

²Учреждение Российской академии наук «Институт теоретической
и экспериментальной биофизики», Пуццо

Исследование проведено на культивируемых адипоцитах белой жировой ткани мышей. Преадипоциты были выделены у здоровых животных и животных с ожирением и диабетом 2-го типа. С помощью окрашивания жировых пулов красителем Oil red показано, что в клетках нормальных животных на 3–9 день культивирования в присутствии глюкозы происходит формирование пулов триглицеридов. В адипоцитах из животных с диабетом 2-го типа формирование пулов триглицеридов не наблюдается. Культивирование последних в тех же условиях, но с добавлением 1 мкМ пальмитоил-карнитина приводило к образованию жировых капель в клетках. Амплитуда Ca^{2+} -ответа адипоцитов, выделенных из тучных животных, на главный активатор липолиза норадреналин была гораздо ниже по сравнению с контрольными животными. Ca^{2+} -ответ на норадреналин адипоцитов из мышей с диабетом 2-го типа практически отсутствовал. Культивирование в присутствии 100 нМ пальмитоил-карнитина приводило к восстановлению Ca^{2+} -ответов в адипоцитах, полученных из тучных животных и животных с диабетом 2-го типа.

Ключевые слова: адипоциты, норадреналин, Ca^{2+} , диабет 2-го типа, пальмитоил-карнитин, пул триглицеридов

NORADRENALINE RESISTANCE IN ADIPOCYTES OF MICE WITH OBESITY AND TYPE 2 DIABETES

¹Turovsky E.A., ¹Turovskaya M.V., ¹Tolmacheva A.V., ¹Dolgacheva L.P.,
¹Zinchenko V.P., ^{1,2}Dynnik V.V.

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: turovsky.84@mail.ru;

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino

The study was carried out in cultured mouse adipocytes of white adipose tissue. Preadipocytes were isolated from healthy animals and mice with obesity and type 2 Diabetes. Using an Oil red staining we show that the triacylglycerol pools were formed on 3–9 day in vitro over a glucose in adipocytes from healthy mice. The triacylglycerol pools are not observed in cultured adipocytes for mice with type 2 Diabetes. Addition in the incubation medium of 1 μM palmitoyl carnitine initiated the triacylglycerol pools in cultured adipocytes for mice with type 2 Diabetes. The amplitude of the Ca^{2+} -response on noradrenaline was much lower in adipocytes from obese mice in comparison with control animals. Addition in the incubation medium of 100 nM palmitoyl carnitine restored of the Ca^{2+} -responses on noradrenaline in adipocytes (9DIV) which were isolated from mice with obesity and type 2 Diabetes.

Keywords: adipocytes, norepinephrine, Ca^{2+} , II type diabet, palmitoil carnitine, pool of triglyceride

Белая жировая ткань играет главную роль в поддержании энергетического гомеостаза организма при голодании и физической нагрузке за счет липолиза запасенных триглицеридов. В результате липолиза происходит расщепление триглицеридов и высвобождение жирных кислот и глицерола. Эволюционно этот процесс обеспечивает выживание в условиях длительного отсутствия пищи. Жировая ткань является важным метаболическим органом, который играет решающую роль в инсулиновой чувствительности и энергетическом гомеостазе всего организма [10]. Жировые клетки секретируют несколько типов адипокинов, которые регулируют физиологические процессы во всем организме (включая метаболизм глюкозы, аппетит, воспалительные ответы, ангиогенез, давление и репродуктивную функцию). При

ожирении наблюдаются нарушения в экспрессии адипокинов и утилизации глюкозы и липидов, поступающих из пищи, что способствует развитию гипергликемии, гиперлипидемии, инсулиновой резистентности и хроническому воспалению [12]. Таким образом, дисфункция белой жировой ткани при ожирении является важным фактором в патогенезе диабета 2-го типа (D2T) и других метаболических болезней. Два противоположных процесса, липогенез и липолиз, участвуют в энергетическом гомеостазе. В результате липогенеза клетка запасает триглицериды. Длинноцепочечные неэтерифицированные жирные кислоты (предшественники триглицеридов) образуются:

- 1) в результате гидролиза липопротеинов плазмы;
- 2) за счет синтеза *de novo* в адипоцитах;

3) за счет реутилизации образовавшихся свободных жирных кислот в результате липолиза [1; 3; 15].

Другим предшественником триглицеридов является глицерол 3-фосфат. Глицерол 3-фосфат образуется в основном из глюкозы, которая поступает в адипоциты с помощью инсулин-стимулированного транспорта (GLUT4). Симпатическая нервная система и нейротрансмиттер норадреналин (НА) играют важную роль в регуляции липолиза в белой жировой ткани [11]. В данной работе исследована интенсивность липогенеза и чувствительность к норадреналину культивируемых адипоцитов белой жировой ткани, выделенных у животных с ожирением и диабетом 2-го типа.

Материалы и методы исследования

Для индукции ожирения у грызунов использовали диету с высоким содержанием жира (20 г жира на 100 г корма, 7,74 кДж/г). Контрольных животных содержали на стандартной лабораторной диете (10 г жира на 100 г корма, 3,29 кДж/г). Для быстрого развития диабета 2-го типа (D2T), характеризующегося инсулиновой резистентностью, животным вводили внутривентально стрептозотацин для подавления β -клеток поджелудочной железы (STZ, 50–100 мг/кг). Животных использовали в эксперименте спустя 2–3 недели после введения STZ. Состояние животных характеризовалось снижением концентрации инсулина на 20–30% в сравнении с контролем, и 2–3-кратным повышением концентрации глюкозы, жирных кислот и триглицеридов, а также увеличением TNF α и CRP на 30–40%. В экспериментах использовали первичную культуру белых адипоцитов мыши на 9 день культивирования (9 DIV), полученную из мезенхимальной фракции стволовых клеток эпидидимального жирового депо в соответствии с общепринятой методикой [13]. Для изучения накопления жировых включений белыми адипоцитами производили окраску клеток с помощью зонда Oil Red (Fluka). После промывки клеточной культуры белых адипоцитов фосфатным буфером (PBS) производили фиксацию клеток 10% раствором формальдегида в течение 1 часа. Далее клетки трижды отмывали PBS, добавляли Oil Red и в течение 1 часа инкубировали при 37°C. После чего зонд отмывали и культура клеток высушивалась в течение 15–20 минут. Измерение динамики цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) проводили с помощью системы анализа изображений «Cell observer» (Carl Zeiss, Германия), на базе моторизованного микроскопа Axiovert 200M 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.

Результаты исследования и их обсуждение

Липогенез. К предшественникам триглицеридов, запасаемых в жировых депо адипоцитов, относятся длинноцепочечные неэстерифицированные (свободные) жир-

ные кислоты и глицерол-3-фосфат. Внутриклеточный глицерол-3-фосфат образуется в основном из глюкозы, транспортируемой в адипоциты переносчиком GLUT-4, активность которого инициируется инсулином. На рис. 1 (верхний ряд) представлены культуры адипоцитов (3 DIV, 5 DIV, 9 DIV), выделенные у мышей с D2T. Адипоциты на 9 день культивирования являются дифференцированными клетками. Окрашивание жировых пулов адипоцитов красителем (Oil red) показало, что в культуре, полученной из животных с диабетом 2-го типа, не происходит формирование триглицеридных пулов при использовании глюкозы в качестве субстрата (рис. 1, верхний ряд). Длинноцепочечная кислота (16:0) пальмитоилкарнитин относится к предшественникам триглицеридов, транспортируемых в клетку мембранным переносчиком. На рис. 1 (нижний ряд) показано, что культивирование адипоцитов в присутствии 10 мМ глюкозы и 100 нМ пальмитоилкарнитина инициировало образование и накопление жировых капель в клетках.

Изменение $[Ca^{2+}]_i$ под действием норадреналина. Симпатическая нервная система и нейротрансмиттер норадреналин (НА) играют важную роль в процессе липолиза в белой жировой ткани [11]. Воздействие НА на функции жировой клетки является комплексным и активирует не только различные подтипы адренорецепторов, но и различные системы трансдукции сигнала. Считается, что НА стимулирует липолиз через активацию β -адренорецепторов, сопряженных со стимуляцией аденилатциклазы, синтезом cAMP, активацией протеинкиназы A, ключевых липаз ATGL (жировая триглицеридлипаза) и HSL (гормонально чувствительная липаза), и фосфорилированием перилипина (белка, расположенного на поверхности жировых депо и защищающего триглицериды от липолиза). Однако стимуляция липолиза норадреналином сохраняется и у мышей с нокаутом $\beta 1/\beta 2/\beta 3$ -адренорецепторов [11] и, возможно, реализуется с участием α -адренорецепторов, активация которых может сопровождаться изменением концентрации Ca^{2+} . Изменение $[Ca^{2+}]_i$ под действием норадреналина в адипоцитах (9DIV) показано на рис. 2. На рис. 2 представлены Ca^{2+} -ответы адипоцитов, выделенных из разных животных: в норме (1), тучных (2) и с диабетом 2-го типа (3). Амплитуда Ca^{2+} -ответа на норадреналин у тучных животных ниже в (4–12) раз по сравнению с контрольными животными, а у мышей с D2T Ca^{2+} -ответ практически отсутствует даже для очень высоких концентраций НА (рис. 2, а).

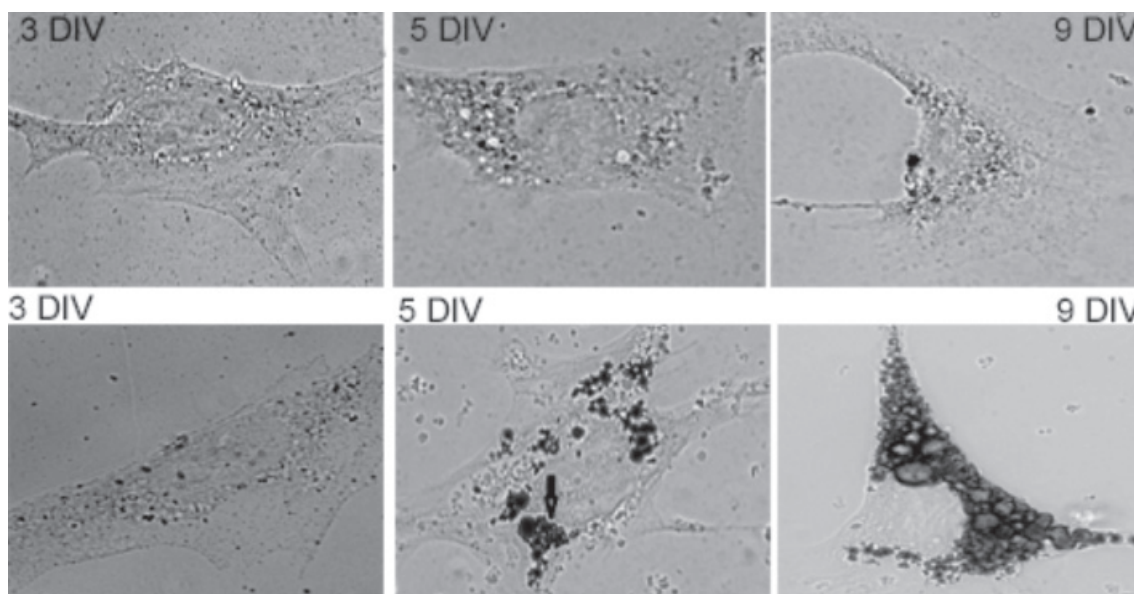


Рис. 1. Жировые пулы культивируемых адипоцитов мышей с D2T в разные сроки культивирования (3DIV, 5DIV, 9DIV). Окраска Oil red. Верхний ряд – культивирование клеток с 10 mM глюкозы. Нижний ряд – культивирование клеток с 10 mM глюкозы и 100 нМ пальмитоил-карнитина

Известно, что пальмитоил-карнитин и пальмитоил-КоА инициируют мобилизацию Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула в скелетных мышцах [4]. Чтобы показать действие пальмитоил-карнитина на Ca^{2+} -ответ адипоцитов при аппликации НА, адипоциты здоровых и больных животных,

начиная с 3-го дня, культивировали в присутствии 100 нМ пальмитоил-карнитина. Как следует из рис. 3, присутствие пальмитоил-карнитина в среде культивирования привело к восстановлению Ca^{2+} -ответа на НА в адипоцитах (9DIV), полученных из тучных животных и животных с D2T.

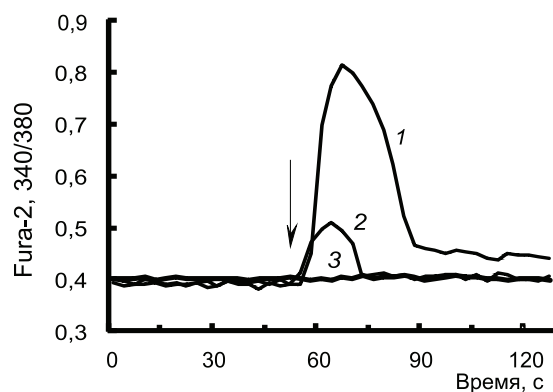


Рис. 2. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ под действием 100мкМ норадреналина в адипоцитах, выделенных у мышей в норме (1), с ожирением (2) и D2T (3)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что в условиях D2T наряду с инсулиновой резистентностью, приводящей к ухудшению транспорта глюкозы в клетки и подавлению синтеза жирных кислот *de novo*, наблюдается и резистентность к норадреналину, которая снимается при добавлении в среду культивирования пальмитоил-карни-

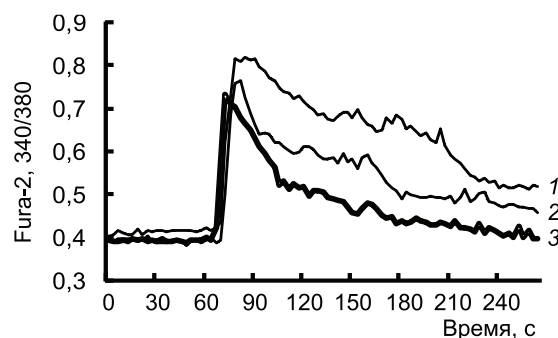


Рис. 3. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ под действием 100мкМ норадреналина в адипоцитах, выделенных у мышей в норме (1), с ожирением (2) и D2T (3) при добавлении в среду культивирования 100 нМ пальмитоил-карнитина

тина. Одной из важных физиологических функций адипоцитов белого жира является способность запасать энергию в виде триглицеридов, необходимую другим тканям при голодании и физической нагрузке [7]. В настоящей работе показано, что преадипоциты, выделенные у мышей с D2T, не способны в условиях культивирования в присутствии глюкозы формировать депо

триглицеридов и генерировать Ca^{2+} -ответ на НА. Эффекты, по-видимому, связаны с нарушениями в транспорте глюкозы. Транспорт глюкозы в адипоцитах обеспечивается транспортером GLUT4, транслокация которого на плазматическую мембрану инициируется инсулином. При D2T имеет место резистентность к инсулину, которая вызывает нарушения в сигнальном пути $\text{IR} \rightarrow \text{IRS} \rightarrow \text{PI3K} \rightarrow \text{PI}(4,5)\text{P}_3 \rightarrow \text{PKB}$, связанные с недостаточными фосфорилированием первых четырех компонентов и активацией PKB и оказывающие негативное влияние на транслокацию транспортера GLUT4. Для ряда клеток известно, что транслокация GLUT4 и транспорт глюкозы увеличиваются при активации АМР-киназы [9; 16; 6]. Одним из активаторов АМР-киназы, энергетического сенсора, поддерживающего баланс АМР:АТФ соотношения, является пальмитат [2; 5; 14]. Также показано, что такие производные длинноцепочечных жирных кислот, как пальмитоил-карнитин и пальмитоил-КоА, в микромолярных концентрациях стимулируют связывание 'Н-рианоидина и вызывают мобилизацию Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума скелетных мышц млекопитающих. Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и АМР (при уменьшении клеточного АТФ) приводит к синергичной активации АМР-киназы [4; 8].

Эндоплазматический ретикулум не только играет центральную роль в липидном и белковом биосинтезе, синтезирует почти все секретируемые белки и продуцирует трансмембранные белки и липиды для большинства клеточных органелл, но и играет важную роль в регуляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Как следует из результатов, полученных в данной работе, активация адипоцитов (9DIV), выделенных у животных с диабетом 2-го типа, норадреналином недостаточна для генерации Ca^{2+} транзитного ответа. Добавление в среду культивирования пальмитоил-карнитина восстанавливало способность адипоцитов генерировать Ca^{2+} -ответ на норадреналин и важную физиологическую функцию запасаания триглицеридов.

Заключение

В данной работе показано, что наряду с инсулиновой резистентностью в клетках белого жира в условиях ожирения и диабета 2-го типа наблюдается резистентность к адренергической стимуляции. Кальциевый ответ адипоцитов, полученных из тучных животных и мышей с индуцированным диабетом 2-го типа на аппликацию различных концентраций норадреналина, значительно снижен или отсутствует.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы № 7 Президиума РАН (проект № 01201258223); Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК 16.512.11.2092, № 01201179771); ФНМ – проект № 01201256033; РФФИ – № 10-04-01306.

Список литературы

1. Brooks B., Arch J.R.S., Newsholme E.A. Effects of hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty acid substrate cycle in adipocytes and epididymal fat pads // *FEBS Lett.* – 1982. – Vol. 146. – P. 327–330.
2. Clark H., Carling D., Saggerson D. Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – Vol. 271. – P. 2215–2224.
3. Edens N. K., Leibel R. L., Hirsch J. Mechanism of free fatty acid reesterification in human adipocytes in vitro // *J. Lipid Res.* – 1990. – Vol. 31. – P. 1423–1431.
4. El-Hayek R., Valdivia C., Valdivia H.H., Hogan K., Coronado R. Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by palmitoyl carnitine // *Biophys J.* – 1993. – Vol. 65, № 2. – P. 779–789.
5. Fediuc S., Gaidhu M.P., Ceddia R.B. Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells // *J. Lipid Res.* – 2006. – Vol. 47. – P. 412–420.
6. Kurth-Kraczek E.J., Hirshman M.F., Goodyear L.J., Winder W.W. AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle // *Diabetes* – 1999. – Vol. 48, № 5. – P. 1667–1671.
7. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome // *Pharmacological Research.* – 2006. – Vol. 53. – P. 482–491.
8. Dumonteil E., Barré H., Meissner G. Effects of palmitoyl carnitine and related metabolites on the avian Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} release channel // *J. Physiol.* – 1994. – Vol. 479, № 1. – P. 29–39.
9. Piwkowska A., Rogacka D., Angielski S., Jankowski M. Hydrogen peroxide induces activation of insulin signaling pathway via AMP-dependent kinase in podocytes // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2012. – Vol. 428, № 1. – P. 167–172.
10. Rosen E.D., Spiegelman B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis // *Nature.* – 2006. – Vol. 444. – P. 847–853.
11. Tavernier G., Jimenez M., Giacobino J.P., Hulo N., Lafontan M., Muzzin P., Langin D. Norepinephrine induces lipolysis in beta1/beta2/beta3-adrenoceptor knockout mice // *Mol Pharmacol.* – 2005. – Vol. 68. – P. 793–799.
12. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat // *Acta Physiol. Scand.* – 2005. – Vol. 184. – P. 285–293.
13. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Berezhnov A.V., Tolmacheva A.V., Kaimachnikov N.P., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Maevskii E.I., Dynnik V.V. Convergence of Ca^{2+} -signaling pathways in adipocytes. The role of L-arginine and protein kinase G in generation of transient and periodic Ca^{2+} -signals // *Biochemistry (Moscow).* – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 35–44.
14. Watt M.J., Steinberg G.R., Chen Z.P., Kemp B.E., Febbraio M.A. Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 574. – P. 139–147.
15. Weber J.M., Reidy S.P. Extending food deprivation reverses the short-term lipolytic response to fasting: role of the triacylglycerol/fatty acid cycle // *J. Exp. Biol.* – 2012. – Vol. 215, № 9. – P. 1484–1490.

16. Yang J., Holman G.D. Insulin and contraction stimulate exocytosis, but increased AMP-activated protein kinase activity resulting from oxidative metabolism stress slows endocytosis of GLUT4 in cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 4070–4078.

References

1. Brooks B., Arch J.R.S., Newsholme E.A. Effects of hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty acid substrate cycle in adipocytes and epididymal fat pads. // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 146. pp. 327–330.
2. Clark H., Carling D., Saggerson D. Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. // *Eur. J. Biochem.* 2004. Vol. 271. pp. 2215–2224.
3. Edens N.K., Leibel R.L., Hirsch J. Mechanism of free fatty acid reesterification in human adipocytes in vitro // *J. Lipid Res.* 1990. Vol. 31. pp. 1423–1431.
4. El-Hayek R., Valdivia C., Valdivia H. H., Hogan K., Coronado R. Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by palmitoyl carnitine // *Biophys J.* 1993. Vol. 65, no. 2. pp. 779–789.
5. Fediuc S., Gaidhu M.P., Ceddia R.B. Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells // *J. Lipid Res.* 2006. Vol. 47. pp. 412–420.
6. Kurth-Kraczek E.J., Hirshman M.F., Goodyear L.J., Winder W.W. AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle // *Diabetes* 1999. Vol. 48, no. 5. pp. 1667–1671.
7. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome // *Pharmacological Research* 2006. Vol. 53. pp. 482–491.
8. Dumonteil E., Barré H., Meissner G. Effects of palmitoyl carnitine and related metabolites on the avian Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} release channel // *J. Physiol.* 1994. Vol. 479, no. 1. pp. 29–39.
9. Piwkowska A., Rogacka D., Angielski S., Jankowski M. Hydrogen peroxide induces activation of insulin signaling pathway via AMP-dependent kinase in podocytes. //

Biochem Biophys Res Commun. 2012. Vol. 428, no. 1. pp. 167–172.

10. Rosen E.D., Spiegelman B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis // *Nature.* 2006. Vol. 444. pp. 847–853.

11. Tavernier G., Jimenez M., Giacobino J. P., Hulo N., Lafontan M., Muzzin P., Langin D. Norepinephrine induces lipolysis in beta1/beta2/beta3-adrenoceptor knockout mice // *Mol Pharmacol.* 2005. Vol. 68. pp. 793–799.

12. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat // *Acta Physiol. Scand.* 2005. Vol. 184. pp. 285–293.

13. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Berezhnov A.V., Tolmacheva A.V., Kaimachnikov N.P., Dolgacheva L.P., Zinchenko V.P., Maevskii E.I., Dynnik V.V. Convergence of Ca^{2+} -signaling pathways in adipocytes. The role of L-arginine and protein kinase G in generation of transient and periodic Ca^{2+} -signals // *Biochemistry (Moscow).* 2012. Vol. 6, № 1. pp. 35–44.

14. Watt M.J., Steinberg G.R., Chen Z.P., Kemp B.E., Febbraio M.A. Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. // *J. Physiol.* 2006. Vol. 574. pp. 139–147.

15. Weber J.M., Reidy S.P. Extending food deprivation reverses the short-term lipolytic response to fasting: role of the triacylglycerol/fatty acid cycle // *J. Exp Biol.* 2012. Vol. 215, no. 9. pp. 1484–1490.

16. Yang J., Holman G.D. Insulin and contraction stimulate exocytosis, but increased AMP-activated protein kinase activity resulting from oxidative metabolism stress slows endocytosis of GLUT4 in cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. pp. 4070–4078.

Рецензенты:

Новоселов В.И., д.б.н., профессор лаборатории механизмов рецепции, Институт биофизики клетки РАН (ИБК РАН), г. Пущино;

Асланиди К.Б., д.ф.-м.н., лаборатория регуляции внутриклеточных процессов, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 10.01.2013.