

Оценка биоэнергетических профилей адипоцитов человека

Измерение митохондриальной функции белой жировой ткани (БелЖТ) демонстрирует нарушение стимулированного жирными кислотами разобщения у лиц, страдающих ожирением.

ОБЛАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сахарный диабет II типа, ожирение, метаболические нарушения

ТИП АНАЛИЗА

Митохондриальная функция, выявление путей, модулирующих потребление энергии

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Адипоциты человека, БелЖТ половых желез мыши, β AR-активация, повышение цАМФ, липолиз, разобщение, ожирение

В настоящее время растет интерес к белой жировой ткани (БелЖТ) благодаря ее важной роли в регуляции метаболического гомеостаза, помимо пассивного накопления липидов. Однако при исследовании создаются трудности со зрелыми адипоцитами и белой жировой тканью (БелЖТ), поскольку они нагружены липидами и всплывают на поверхность среды. Следовательно, привлекает возможность культивирования дифференцированных, зрелых адипоцитов и белой жировой ткани (БелЖТ) на культуральных планшетах, обеспечивающая измерение митохондриального дыхания и гликолиза и создание биоэнергетического профиля.

В данном указании по применению описывается способ характеристики митохондриальной функции жировой ткани в адгезивных адипоцитах или фрагментах тканей с использованием анализатора XF24. Полученные результаты показывают, что повышенный уровень цАМФ усиливает липолиз, который, в свою очередь, увеличивает разобщение и потребление энергии (ПЭ) в белой жировой ткани (БелЖТ). Данное указание также демонстрирует удивительную и неожиданную роль пор, изменяющих проницаемость митохондриальной мембраны (РТР), в данной реакции разобщения.

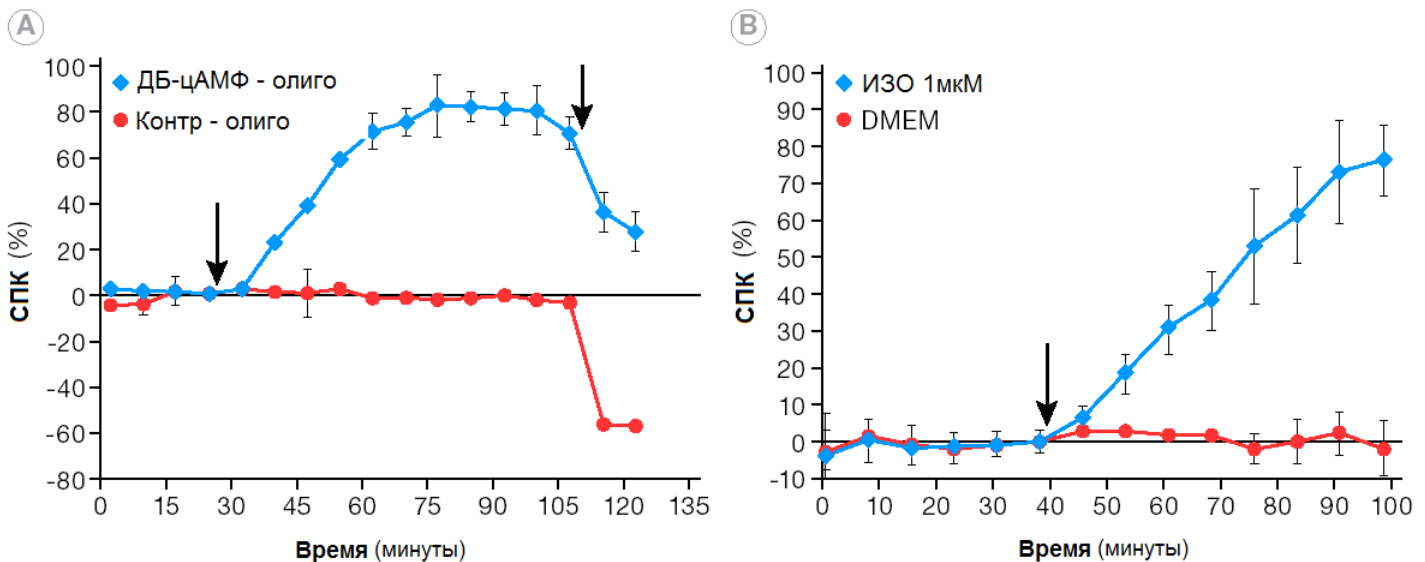
Einav Shnaidman с соавт.¹ впервые провели исследование митохондриальной функции адипоцитов человека, полученных из преадипоцитов, дифференцированных в клеточных культуральных микропланшетах XF. Адипоциты стимулировали изопротеренолом (ИЗО), форсколином (ФСК) или дибутирил-цАМФ (ДБ) – препаратами, вызывающими повышение цАМФ-сигналов – и затем подвергали митохондриальному стресс-тесту. Митохондриальный стресс-тест измеряет базальное дыхание, утечку протонов (при добавлении олигомицина) и резервную дыхательную емкость (при добавлении разобщающего агента). Данные анализы можно проводить с помощью анализатора XF, поскольку до проведения анализа адипоциты не требуются отделять от планшетов.

На рисунке 1 показано усиление базального дыхания, определяемое по потреблению кислорода (СПК), с увеличением уровня цАМФ. Использование митохондриального стресс-теста продемонстрировало, что увеличение митохондриальной утечки было обусловлено усилением липолиза и повышением уровня жирных кислот (ЖК). Данное повышение СПК может быть заблокировано захватом жирных кислот с помощью БСА или разборкой ATGL с помощью подавляющих липолиз кИРНК. Дальнейшие исследования с использованием различных методов и соединений, включая применение кИРНК в зрелых адипоцитах в сочетании с анализами XF, показали, что усиление дыхания, по-видимому, требует активации белка Вах, который, в свою очередь, регулирует открытие пор, изменяющих проницаемость мембраны.¹

Рисунок 1 | Повышение уровня цАМФ в адипоцитах или белой жировой ткани (БелЖТ) приводит к усилению дыхания

А. Обработка дибутирил-цАМФ (ДБ) приводит к быстрому усилению дыхания в адипоцитах. Обработка олигомицином снижает СПК в необработанных клетках контроля значительно в большей степени, чем в адипоцитах, обработанных ДБ-цАМФ, что свидетельствует об увеличении утечки (разобшение) при возрастающих уровнях цАМФ.

Б. С помощью микропланшетов для островков поджелудочной железы (Islet Capture Microplates) XF проводили анализ фрагментов белой жировой ткани половых желез мышей (10 мг). Изопротеренол (ИЗО) вызывает повышение уровня цАМФ. ↓



В жировой ткани половых желез мышей также воспроизводили поглощение усиленного дыхания после повышения уровней цАМФ, что также доказывает возможность анализа соединительной жировой ткани с помощью анализатора XF. Одновременно проводили сравнение реакции на ИЗО в адипоцитах худых и тучных доноров, в результате которого было выявлено нарушение реакции на ИЗО в адипоцитах лиц, страдающих ожирением (рисунок 2).

Обсуждение

Повышение потребления энергии (ПЭ) в белой жировой ткани (БелЖТ), возможно, является методом борьбы с ожирением. Поскольку белая жировая ткань (БелЖТ) у тучных людей занимает значительную долю массы тела, вызывает интерес направленное воздействие на данную ткань. Gromada с соавт.² обрабатывал человеческие адипоциты фактором роста фибробластов 21 (ФРФ21). Далее проводил анализ клеток с помощью анализатора XF24 и митохондриальный стресс-тест. Было установлено, что обработка ФРФ21 усиливала базальное дыхание и, что более важно, повышала способность клеток к окислительному метаболизму.

В последние годы было выявлено, что взрослые люди имеют небольшие отложения бурой жировой ткани (БурЖТ), разбросанные среди белой жировой ткани (БелЖТ). Данная ткань, экспрессирующая разобщающий белок 1 (РБ1), который разобщает выработку АТФ и окислительное фосфорилирование путем активации потока H⁺ через внутреннюю митохондриальную мембрану, производящую тепло. Таким образом, бурая жировая ткань (БурЖТ) также представляет собой хорошую модельную систему для исследования потребления энергии.

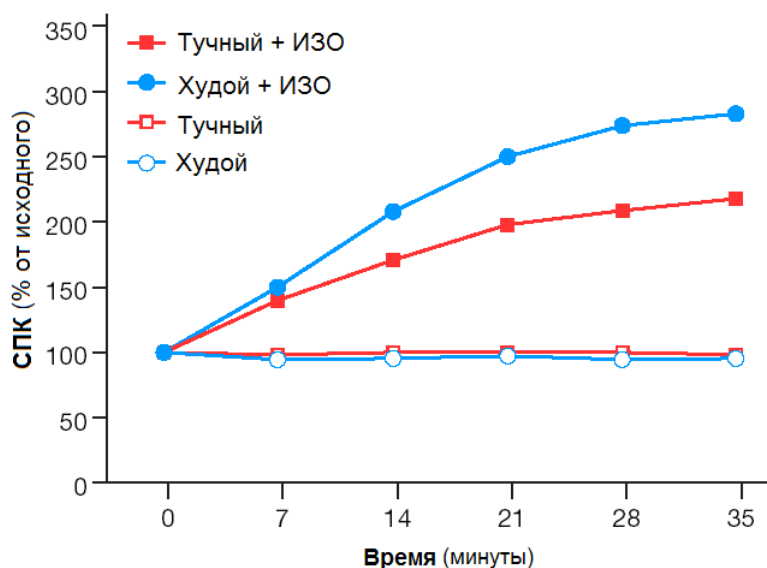
Johan Auwerx с соавт.^{3,4} сосредоточили свое внимание на роли желчных кислот и их способности повышать потребление энергии в бурой жировой ткани (БурЖТ). С помощью анализатора XF они показали, что желчные кислоты и миметики увеличивают потребление энергии посредством рецептора TGR5, связанного с G-белком, и дейодиназы II типа. В другом исследовании Auwerx с соавт. изучал потребление энергии в бурой жировой ткани (БурЖТ) с использованием SIRT1-миметиков. Ранее ими было установлено, что ресвератрол, входящий в состав красного вина и обнаруживаемый в коже красного винограда, может повышать СПК и, следовательно, потребление энергии посредством SIRT1, а также представлены новые соединения, обладающие способностью имитировать эти действия в бурой жировой ткани (БурЖТ).⁵

Hall с соавт.⁶ исследовали роль дейодиназы II типа (D2) и гормонов щитовидной железы в образовании бурого жира. С помощью анализатора XF они показали, что адипоциты бурого жира, полученные при выключении D2, не могли повышать СПК после стимуляции по сравнению с адипоцитами дикого типа.

Два исследования изучали нарушение метаболизма липидов в бурой жировой ткани (БурЖТ) и нарушение потребления энергии. Vergnes с соавт.⁷ использовали адипоциты и фрагменты бурой жировой ткани (БурЖТ) для демонстрации необходимости в белке, связывающего жирные кислоты (БСЖКЗ), для эффективного окисления жирных кислот (ЖК) в бурой жировой ткани (БурЖТ), что изменяет устойчивость к низким температурам. Ellis с соавт.⁶ применяли выделенные из бурой жировой ткани (БурЖТ) митохондрии для демонстрации аналогичной необходимости в длинноцепочечной ацил-КоА-синтетазе-1 (ACSL1) для окисления ЖК. Полученные результаты совпадали с результатами исследований, проводимых с использованием меченных радиоизотопом ЖК для оценки окисления ЖК.

Рисунок 2 | Нарушение реакции на повышение цАМФ в адипоцитах у лиц с ожирением

Дыхание в адипоцитах человека, полученных у худых (кружки) или тучных (квадраты) людей. Отмечается значительное снижение реакции на изопротеренол (незакрашенные символы) в адипоцитах, полученных у тучных лиц.



Материалы и методы

Ткань: свежесыведенную белую жировую ткань (БелЖТ) половых желез мышей промывали средой XF-DMEM, содержащую 25 мМ HEPES, очищали от нежирового материала и разрезали на фрагменты (~10 мг). После тщательной промывки один фрагмент ткани помещали в каждую лунку микропланшета XF24 Islet Capture (Seahorse Bioscience) и покрывали экраном для захвата островков поджелудочной железы, обеспечивающим свободную перфузию при минимизации движения ткани. Добавляли среду для проведения анализа XF (500 мкл) и проводили анализ образцов в анализаторе XF24.

Клетки: проводили посев преадипоцитов человека (Zen-Bio, RTP, NC) в покрытые 0,2%-ным желатином 24-луночные клеточные культуральные микропланшеты XF24 (13000 клеток в лунке) и выращивали в течение 24-48 часов в среде для преадипоцитов (PM-1, Zen-Bio), содержащей: DMEM/F12 (1:1, в объемном соотношении), HEPES (pH 7,4), 10% ФБС и антибиотики. Клетки дифференцировали в течение 7 дней в среде, содержащей: DMEM/F12 (1:1; в объемном соотношении), HEPES (pH 7,4), 10% ФБС, биотин, пантотенат, инсулин, дексаметазон, IBMX и агонист PPAR γ , не относящийся к ТЗД (DM-2, Zen-Bio), с последующей дополнительной неделей в среде для поддержки адипоцитов (AM-1, Zen-Bio: DM-2 без IBMX и агониста PPAR γ). Дифференцированные адипоциты промывали 1 мл средой XF-DMEM, содержащей 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ GlutaMAX-1TM, 17,5 мМ глюкозы, 1,85 г/л NaCl, 15 мг/л фенола красного, pH 7,4), и затем добавляли в объеме 500 мкл в каждую лунку для проведения анализа.

Биоэнергетический анализ XF

Биоэнергетические анализы белой жировой ткани проводили с помощью Анализатора XF (Seahorse Bioscience). В специальных клеточных культуральных микропланшетах анализатора XF образуется транзитная микрокамера объемом всего несколько микролитров. Это позволяет осуществлять мониторинг СПК (скорости потребления кислорода) и ECAR (скорости закисления внеклеточной среды) в режиме реального времени.

Лекарственные препараты разводили до окончательных концентраций: ИЗО (1 мкМ), ФСК (10 мкМ), олигомицин (олиго, 1 мкг/мл), FCCP (0,6 мкМ) и ротенон (3 мкМ). Оптимальные концентрации лекарственных средств определяли в предварительных экспериментах. Вначале измеряли базальное дыхание до введения лекарственного препарата с последующим последовательным добавлением ИЗО или ФСК, олиго, FCCP и ротенона. Оценка скорости проводилась между добавлением каждого препарата. Ротенон способствует блокированию митохондриального дыхания, поэтому любое остаточное дыхание является «немитохондриальным» и вычитается из других скоростей. Дыхание после введения олигомицина будет приблизительно равняться утечке (разобщению) внутренней митохондриальной мембраны, FCCP (титрованный до достижения максимального дыхания) позволяет определять дыхательную емкость.

Рисунок 3 | Схема проведения анализа XF



Ссылки

1. Yehuda-Shnaidman E, et al. *Acute stimulation of white adipocyte respiration by PKA-induced lipolysis*. Diabetes 2010, 59(10):2474-83.
2. Chau MD, et al. *FGF21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-Sirt1-PGC-1 α pathway*. PNAS 2010, 107:12553-558.
3. Watanabe M, et al. *Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation*. Nature 2006, 26:484-9.
4. Thomas C, et al. *TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis*. Cell Metab 2009,10(3):167-77.
5. Feige JN, et al. *Specific SIRT1 Activation Mimics Low Energy Levels and Protects against Diet-Induced Metabolic Disorders by Enhancing Fat Oxidation*. Cell Metab 2008, 8(5):347-58.
6. Hall JA, et al. *Absence of Thyroid Hormone Activation during Development Underlies a Permanent Defect in Adaptive Thermogenesis*. Endocrinology 2010, 151(9):4573-82.
7. Vergnes L, et al. *Heart-type fatty acid-binding protein is essential for efficient brown adipose tissue fatty acid oxidation and cold tolerance*. J Biol Chem 2011, 286(1):380-90.
8. Ellis JM, et al. *Adipose Acyl-CoA Synthetase-1 Directs Fatty Acids toward beta-Oxidation and Is Required for Cold Thermogenesis*. Cell Metab 2010, 12(1):53-64.
9. Wu M, et al. *Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells*. Am J Physiol Cell Physiol 2007, 292:C125-136