

## Оценка окисления жирных кислот в мышечных клетках

### Чувствительный нерадиометрический анализ ОЖК в режиме реального времени

#### ОБЛАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ожирение, сахарный диабет и метаболические нарушения

#### ТИПЫ АНАЛИЗА

Утилизация субстрата: окисление жирных кислот

#### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Окисление жирных кислот, пальмитат, Этомоксир, радиометрический, метформин, миобласты L6

Нарушение метаболизма жирных кислот в скелетных мышцах может приводить к инсулинорезистентности и накоплению липидов в нежировой ткани. Подобное накопление играет важнейшую роль в патогенезе хронических заболеваний, таких как сахарный диабет и сердечная недостаточность.

Для исследования механизмов, лежащих в основе данных процессов, исследователи измеряли утилизацию жирных кислот в мышечных на фоне ожирения и снижения массы тела, а также в ответ на известные и новые потенциальные лекарственные препараты, влияющие на окисление жирных кислот (ОЖК). Ключевым фактором многих данных исследований является определение нарушения ОЖК, обычно путем количественного определения  $^{14}\text{CO}_2$ , радиоактивного конечного продукта реакции окисления [1].

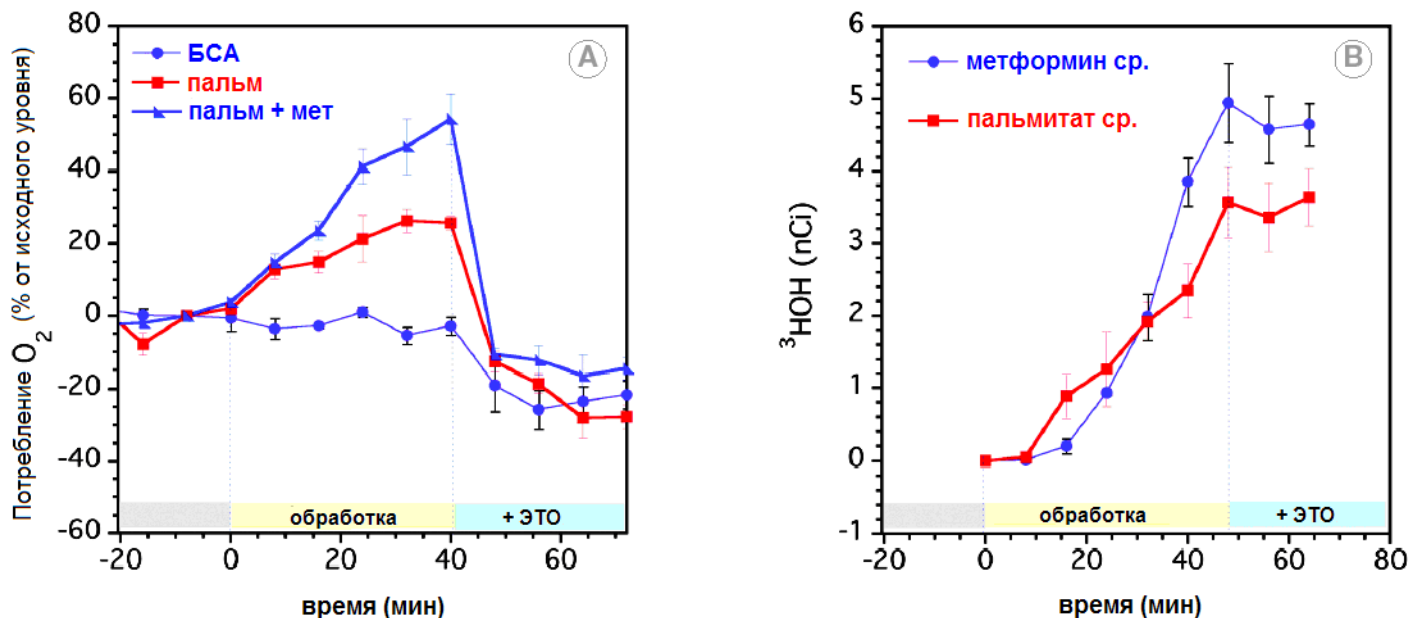
Несмотря на то, что эти и аналогичные анализы позволяют проводить эффективные, специфические измерения, они занимают много времени, требуют использования меченных радиоизотопом жирных кислот, таких как пальмитат или олеат, и обладают только ограниченным кинетическим разрешением, поскольку оценка показателей часто занимает час или больше.

В ранее опубликованной рукописи [2] мы сравнивали результаты, полученные с помощью анализа XF, непосредственного измеряющего скорость потребления кислорода (СПК), с результатами радиометрического анализа, оценивающего продукт реакции ОЖК,  $^3\text{HON}$ . Анализ внеклеточного потока (XF), проведенный с помощью анализатора внеклеточного потока XF (Seahorse Bioscience, Биллерика, штат Массачусетс), выявляет изменения окислительного дыхания, определяемые по СПК, в результате добавления экзогенных жирных кислот в культуру мышечных клеток. На основании определения СПК в режиме реального времени мы демонстрируем, что с помощью анализа XF можно оценивать потоки метаболитов с точностью, сопоставимой с таковой при использовании радиометрических анализов.

Мы использовали миобласты L6, необработанные или обработанные бигуанидом метформинном (Глюкофаж), имеющимся в продаже лекарственным препаратом для лечения сахарного диабета 2-го типа, который действует за счет повышения регуляции АМФК, в качестве модельной системы для данного анализа. На рисунке 1 показаны сходство и различия между XF и радиометрическим анализами, проведенными параллельно с помощью определения клеточных реакций на введение экзогенного пальмитата.

**Рисунок 1 | Переход от окисления глюкозы к ОЖК в клетках миобластов L6**

Добавление пальмитата приводит к увеличению СПК в клетках от исходного уровня, специфичность ОЖК определяется путем введения ингибитора СРТ1 – этомоксира. Анализ XF на рисунке 1А демонстрирует кинетику, сходную с таковой при накоплении  $^3\text{HON}$  при введении меченного радиоизотопом пальмитата, показанном на рисунке 1В. Некоторые клетки в течение 2 часов предварительно обрабатывали 1 мМ метформина (мет) для активации АМФ-киназы, стимулирующей ОЖК.



На рисунке 1 XF и радиометрические анализы четко демонстрировали усиление окислительного дыхания вследствие добавления экзогенных жирных кислот в форме пальмитата. Как и предполагалось, предварительная обработка метформином в течение 2 часов повышала использование пальмитата. Тем не менее, основное различие заключается в том, что анализ XF измеряет скорость потребления кислорода практически в режиме реального времени (рисунок 1А). При проведении радиометрического анализа аликвоты брали в указанные моменты времени, но накопление  $^3\text{HON}$  измерялось отдельно, через несколько часов после обработки (рисунок 1В).

За счет использования инъекционных портов анализатора XF для введения глюкозы или пальмитата в лунки, содержащие мышечные трубочки C2C12, обработанные или необработанные метформином, можно измерить сдвиг преимущественного использования субстрата при окислении от глюкозы к пальмитату в режиме реального времени (рукопись в стадии подготовки). Данный преимущественный сдвиг связан со способностью метформина ингибировать митохондриальное дыхание в комплексе I [3].

**Обсуждение**

С помощью анализа XF можно быстро, точно и удобно провести оценку внеклеточных потоков метаболитов для обнаружения и количественного определения скорости потребления кислорода (СПК) как показателя митохондриального дыхания и скорости закисления внеклеточной среды (ECAR, extracellular acidification rate) как индикатора гликолиза. В данном указании вместо исследования пути меченных радиоизотопом жирных кислот для оценки ОЖК в обработанных различными препаратами популяциях мышечных клеток в режиме реального времени используется СПК.

Современное применение этого анализа включает исследование Crunckhorn с соавт., которое показало, что ожирение и насыщенные жирные кислоты снижают уровень PGC-1, а также экспрессию и функцию митохондриального гена за счет MAPK-зависимых транскрипционных путей p38. Данное исследование также продемонстрировало, что пальмитат уменьшал экспрессию цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и окислительного фосфорилирования в митохондриальных генах, а также снижал потребление кислорода в мышечных трубочках C2C12 [4].

В другом исследовании Weinberg с соавт. изучал гипотезу Варбурга в отношении роста опухолевых клеток, которая предполагает, что нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях заставляют опухоль использовать высокий уровень аэробного гликолиза для получения энергии и биосинтетических промежуточных продуктов для активации быстрого роста. При использовании Kras-опосредованной онкогенной модели авторы смогли продемонстрировать, что ЦТК посредством окисления аминокислот и жирных кислот имел решающее значение для туморогенности, индуцированной онкогеном [5].

В ходе исследования с целью определения влияния SIRT1720 на энергетический обмен исследователи оценивали потребление кислорода и определяли активацию АМФК в мышечных трубочках C2C12, обработанных сиртуином, в течение 24 часов без активации АМФК-киназы в мышечных трубочках [6].

И, наконец, используя олеат как источник жирных кислот *in situ*, исследователи смогли продемонстрировать влияние SIRT1 на АМФК-контроль митохондриального дыхания, показав, что АICAR-индуцированное повышение потребления  $O_2$  в митохондриях оказалось значительно сниженным за счет разрушения SIRT1. Это было первым прямым подтверждением того, что АМФК-регуляция митохондриальных генов и генов обмена липидов посредством модуляции PGC-1 $\alpha$  во многом зависит от SIRT1 [7].

**Применяемый для анализа метаболизма жирных кислот, анализ внеклеточного потока (XF), обладающий высокой производительностью, позволяет использовать образцы меньших размеров, устранить необходимость в радиоактивных соединениях и обеспечить параметры кинетического разрешения, которые обычно могут быть получены в течение нескольких минут.**

**Это позволяет методу XF уникальным образом отличать фракцию СПК, связанную с утилизацией жирных кислот, от других субстратов.**

#### Материалы и методы

Клетки: производили посев миобластов L6 (20000 клеток в каждой лунке) в 24-луночные культуральные микропланшеты XF и инкубировали до следующего утра в инкубаторе при температуре 37°C с 10% CO<sub>2</sub>. (В 96-луночный клеточный культуральный микропланшет XF потребуется провести посев приблизительно на 40% меньшего количества клеток). Концентрированный раствор пальмитата натрия (2 мМ) конъюгировали с 0,34 мМ (2,267 г/дл) бычьего сывороточного альбумина (БСА), не содержащего ультражирные кислоты. БСА, не содержащий ультражирные кислоты, был закуплен компанией Roche Diagnostics (Индианаполис, штат Индиана). Компания Seahorse разработала оптимальный протокол по приготовлению комплекса пальмитат-БСА (доступен на веб-сайте).

Среда для определения ОЖК представляет собой низкобуферный КНВ раствор, содержащий 110 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1,2 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 мМ глюкозы, доведенный до pH7,4 путем добавления 0,5 мМ карнитина, 100нМ инсулина, если не указано иное. Концентрации глюкозы могут влиять на способность клеток к поглощению и утилизации пальмитата. Для индукции ОЖК пальмитат вводили до получения конечной концентрации 200 мкМ.

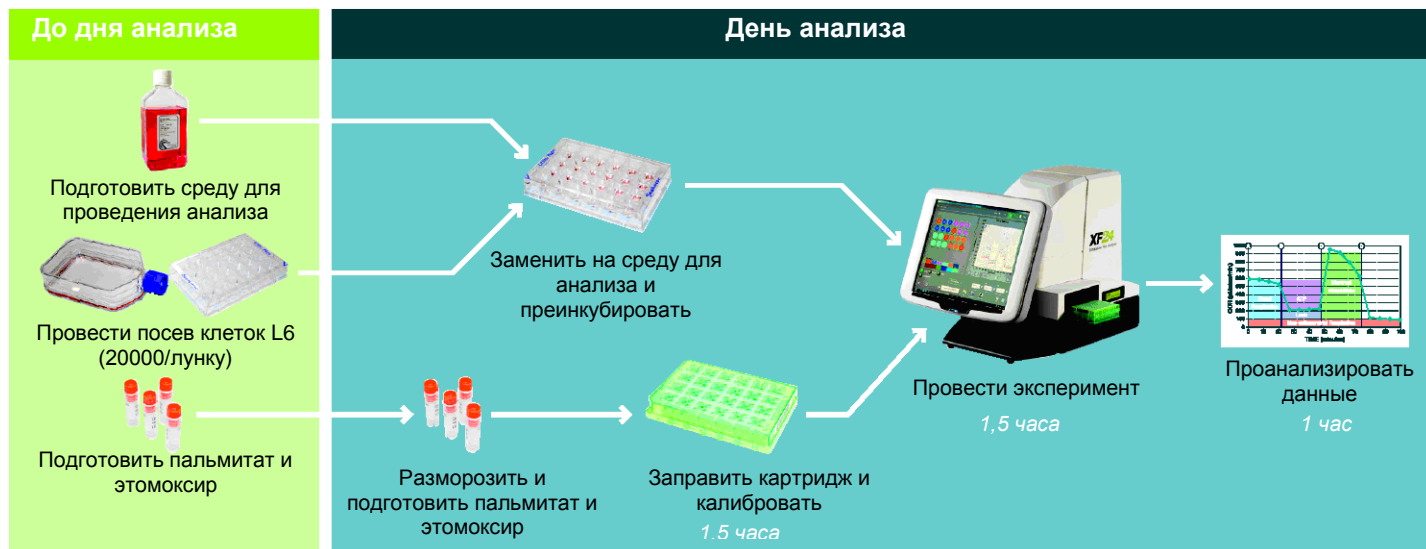
#### Анализ XF

Анализы XF проводились с использованием анализатора внеклеточного потока XF (Seahorse Bioscience, Биллерика, штат Массачусетс), полностью интегрированного, многолуночного прибора, измеряющего поглощение и выведение конечных продуктов метаболизма в режиме реального времени для всех анализов. СПК и ECAR измеряли с помощью набора для анализа XF. Одноразовые наборы для проведения анализа состоят из клеточного культурального планшета XF24 или XF96 и картриджа твердотельного датчика со встроенными 24 или 96 двухфлуоресцентными биосенсорами ( $O_2$  или  $H^+$ ). Каждый картридж датчика также оснащен двумя или четырьмя камерами для доставки препарата (на каждую лунку), необходимыми для введения тестируемых веществ в лунки во время анализа. СПК измеряется в пмоль/мин, ECAR – в мрН/мин.

Для подготовки к анализу, как показано на рисунке 2, культуральную питательную среду L6 удаляли из культуральных планшетов XF, содержащих обработанные и необработанные клетки L6. Далее лунки промывали и ресуспендировали со средой для проведения анализа. Параллельно с этим в инъекционные порты одноразового картриджа датчика предварительно вводили пальмитиновую кислоту в комплексе с БСА или только БСА как наполнитель. Чтобы начать запуск эксперимента XF, необходимо соединить культуральный планшет и картридж датчика и вставить в прибор. До автоматизированного введения пальмитиновой кислоты (0,2 мМ), связанной с наполнителем БСА, или только БСА измеряли 3 исходных значения скорости. После обработки в течение 58 минут добавляли ингибитор карнитинпальмитиновой трансферазы-1 Этомоксир (ЭТО, 50 мкМ).

Некоторые клетки в течение 2 часов предварительно обрабатывали 1 мМ метформина (мет) для активации АМФ-киназы, стимулирующей ОЖК.

Рисунок 2 | Схема проведения анализа XF



Ссылки

1. Palanivel R, Sweeny, G. *Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin*. FEBS Lett. 2005;579(22):5049-54.
2. Ferrick DA, Neilson A, Beeson C. *Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux*. Drug Discov Today. 2008;13(5-6):268-74.
3. Owen MR et al. *Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain*. Biochem J. 2000;348(Pt 3):607-14.
4. Crunckhorn S et al. *Peroxisome Proliferator Activator Receptor gamma Coactivator-1 Expression is Reduced in Obesity: Potential Role of Saturated Fatty Acids and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation*. J Biol Chem. 2007;282:15439-50.
5. Weinberg F et al. *Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity*. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(19):8788-93.
6. Feige JN et al. *Specific SIRT-1 Activation Mimics Low Energy Levels and Protects Against Diet-induced Metabolic Disorders by Enhancing Fat Oxidation*. Cell Metab. 2008;8(5):347-58.
7. Cantó C et al. *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity*. Nature. 2009;458(7241):1056-60.
8. Harwood HJ Jr, et al. *Isozyme-nonselective N-substituted bipiperidylcarboxamide acetyl-CoA carboxylase inhibitors reduce tissue malonyl-CoA concentrations, inhibit fatty acid synthesis, and increase fatty acid oxidation in cultured cells and in experimental animals*. J Biol Chem. 2003;278(39):37099-111.