

Инъекционный препарат MesoSculpt™ C71 и его влияние на накопление и утилизацию липидов белой жировой ткани

1 ВВЕДЕНИЕ

Ранее мы показали, что инъекционный препарат MesoSculpt™ C71 на генном уровне способствует уменьшению массы белой жировой ткани [1]. Это достигается за счет нескольких эффектов. Во-первых, препарат ингибирует экспрессию некоторых ключевых факторов адипогенеза (дифференцировки преадипоцитов в адипоциты), препятствуя росту жировой ткани вследствие увеличения количества клеток (гиперплазии). Во-вторых, MesoSculpt™ C71 ингибирует синтез ряда ферментов липогенеза (накопления жиров в существующих адипоцитах), препятствуя росту жировой ткани вследствие увеличения размеров отдельных клеток (гипертрофии). Наконец, он способствует активному уменьшению массы жировой ткани, стимулируя синтез ферментов, расщепляющих ранее накопленные липиды (триглицериды жирных кислот в липидных каплях).

В данной работе, исследуя активность генов, продукты которых непосредственно участвуют

в метаболизме липидов или регулируют различные его звенья, мы попытались оценить весомость вклада каждого из ранее описанных механизмов в общий баланс липидов, а также выяснить наиболее вероятные пути утилизации жирных кислот, освобождающихся из липидных капель при индуцированном этим препаратом гидролизе триглицеридов.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальной модели дифференцировки адипоцитов была использована иммортализованная клеточная линия мыши 3T3-L1, способная при соответствующих условиях дифференцироваться в адипоциты. Клетки культивировали в среде Игла, модифицированной по Дальбеко (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ПанЭко), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки FBS (HyClone), 2 mM L-глутамин и 10 mM HEPES; pH – 7,2–7,4, t – 37° C, в увлажненной атмосфере (5% CO₂) в пластиковых чашках Петри. Для индукции дифференцировки к клеткам, достигшим 70–80% конфлюентности, добавляли изобутилметилксантин (IBMX) и дексаметазон до конечных концентраций 0,5 mM и 1 мкM соответственно на 48 часов.

Для оценки влияния MesoSculpt™ C71 на дифференцировку преадипоцитов его добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 0,02% на 1,5 часа, после чего клетки отмывали и продолжали выращивать в обычной среде. Смену среды делали каждые 2 дня. Для оценки влияния препарата на зрелые адипоциты его добавляли на 1,5 часа в конце процесса дифференцировки (на 8 сутки). Затем клетки отмывали и культивировали еще 24 часа. Контрольные клетки дифференциро-

В. Ашапкин¹, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,

Л. Кутуева¹, младший научный сотрудник,

Е. Волкова², доктор медицинских наук, профессор кафедры дерматовенерологии,

Б. Ванюшин¹, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом

¹ НИИ физико-химической биологии

им. А.Н. Белозерского, МГУ

им. М.В. Ломоносова,

² лечебный факультет РНИМУ

им. Н.И. Пирогова

Москва, Россия

Инъекционный препарат MesoSculpt™ C71 и его влияние на накопление и утилизацию липидов белой жировой ткани

вали аналогичным образом, но без добавления MesoSculpt™ C71.

По окончании дифференцировки среду удаляли, а к клеткам добавляли реагент, стабилизирующий РНК, RNAprotect Cell Reagent (Qiagen, Германия). После открепления клеток от поверхности чашек Петри под действием реагента образующуюся суспензию переносили в стерильные пластиковые микропробирки и хранили несколько суток в холодильнике до выделения РНК.

Выделение и очистку суммарной РНК из клеток осуществляли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) по прописи, рекомендованной фирмой-производителем. Полученные образцы РНК использовали для синтеза первой цепи кДНК с помощью набора обратной транскрипции Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) по прописи, рекомендованной фирмой-производителем.

В качестве матрицы на каждую реакцию обратной транскрипции объемом 20 мкл использовали 200 нг очищенной суммарной РНК. Полученную реакционную смесь использовали непосредственно как матрицу для ПЦР из расчета 1 мкл смеси на реакцию объемом 25 мкл. Количественную ПЦР с флуоресцентно-мечеными гибридационными зондами (TaqMan qPCR) проводили с помощью набора qPCRmix-HS («Евроген», Россия) и термоциклера ДТ-322 («ДНК-Технология», Россия). В качестве внутреннего стандарта использовали кДНК референсного гена *Gapdh*. Ее концентрацию измеряли в тех же самых ПЦР-смесях, используя меченный другой флуоресцентной меткой гибридационный зонд: динамику амплификации кДНК для исследуемых генов измеряли по росту флуоресценции в канале *Fam*, а динамику амплификации для референсного гена – в канале *Hex*. Полученные данные импортировали в программу Microsoft Excel 2003 и обрабатывали статистически, принимая концентрацию мРНК референсного гена во всех образцах за 1.

Для каждого образца проводили минимум три параллельные ПЦР в соседних лунках при-

бора. Конструирование олигонуклеотидных праймеров и гибридационных зондов для количественной ПЦР осуществляли с помощью онлайн-сервиса IDT PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>), а их синтез – в компании «Синтол» (Россия).

Исследование динамики дифференцировки по соотношению размеров клеток и их гранулярности [2] и с помощью липофильного красителя Nile Red осуществляли на проточном цитофлюориметре Beckman-Coulter FC500, используя аргоновый лазер (488 нм). Ультраструктуру залитых в Эпон клеток исследовали на ультратонких срезах, окрашенных уранил-ацетатом и цитратом свинца под электронным микроскопом JEM-1400 (JEOL, Япония).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлена схема адипогенеза в белой жировой ткани млекопитающих, на которой указаны ключевые регуляторные факторы, исследованные в данной работе.

Побудительными стимулами, запускающими процесс дифференцировки, служат гормональные факторы (глюкокортикоиды, инсулин и гормон роста) и агенты, вызывающие увеличение концентрации цАМФ [3]. Полный цикл адипогенеза занимает 10–12 дней и состоит из двух этапов, каждый из которых контролируется своей группой регуляторных факторов.

На раннем этапе происходит деление (клональная экспансия) преадипоцитов. Главную роль в этом процессе играют факторы транскрипции *C/EBPβ* и *C/EBPδ*. Синтез каждого из них ингибируется MesoSculpt™ C71 в 1,5–2 раза. По окончании клональной экспансии происходит фосфорилирование молекул *C/EBPβ* и *C/EBPδ*, в результате чего они приобретают способность индуцировать синтез факторов позднего адипогенеза.

Решающую роль в позднем этапе адипогенеза и поддержании стабильного фенотипа дифференцированных адипоцитов играют мастер-регуляторы адипогенеза – транскрипционные факторы *PPARγ* и *C/EBPα*, объединенные в единую регуляторную систему взаимными положительными обратными связями. Наиболее важные «помощники» мастер-регуляторов – транскрипционные факторы *C/EBPz*

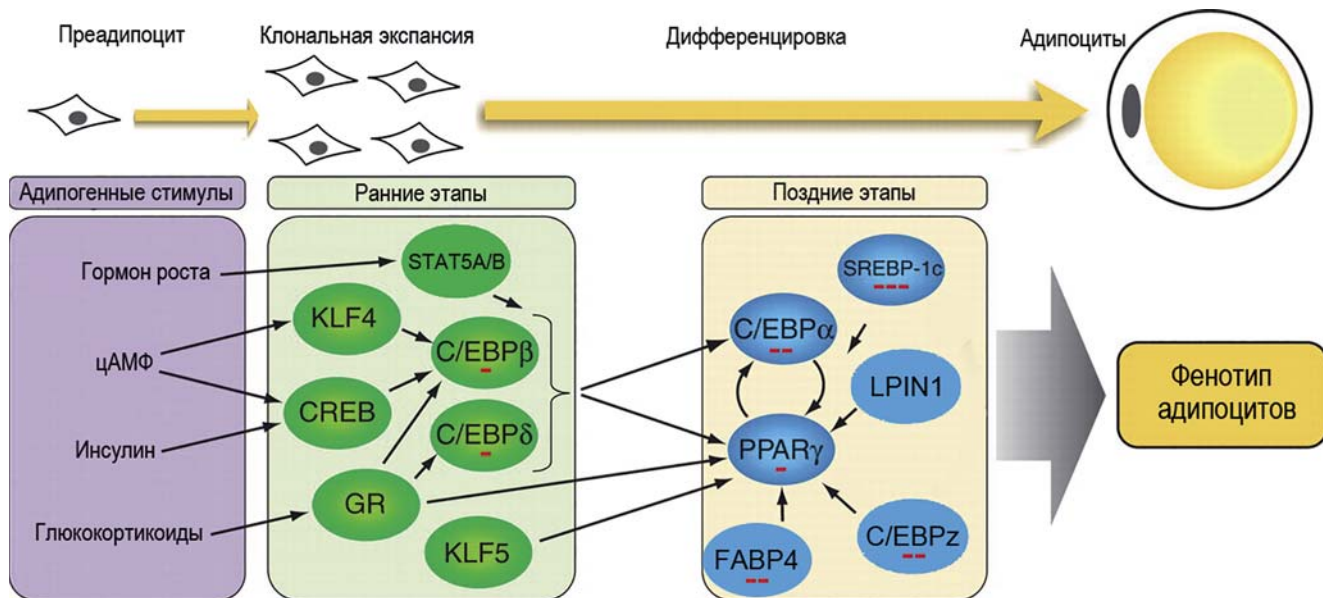


Рис. 1. Факторы регуляции адипогенеза. Зеленым цветом показаны факторы раннего адипогенеза, активируемые адипогенными гормонами и цАМФ. В свою очередь, они индуцируют синтез факторов позднего адипогенеза (показаны синим цветом), контролирующих окончательную дифференцировку и поддержание стабильного фенотипа зрелых адипоцитов. KLF – Krüppel-like factor, CREB – cAMP response element binding protein, C/EBP – CCAAT/enhancer binding protein, GR – glucocorticoid receptor, STAT5A/B – signal transducer and activator of transcription 5A/B, PPAR γ – peroxisome proliferator-activated receptor γ , FABP4 – fatty acid binding protein 4, LPIN1 – lipin 1, SREBP-1c – sterol regulatory element binding protein 1c. Красными минусами указано обнаруженное влияние MesoSculpt™ C71 на экспрессию соответствующих генов: один минус – слабое ингибирование (менее чем в 2 раза), два минуса – умеренное ингибирование (в 2–5 раз), три минуса – сильное ингибирование (более чем в 5 раз)

и SREBP-1c, белок транспорта жирных кислот FABP4 и белок-коактиватор липин 1 (LPIN1, также известный как фосфогидролаза фосфатидных кислот).

MesoSculpt™ C71 оказывает слабовыраженное ингибирующее действие на активность гена PPAR γ , умеренно ингибирует экспрессию генов CEBP α , CEBP ζ и FABP4 и сильно – гена SREBP-1c. Таким образом, MesoSculpt™ C71 в значительной степени подавляет адипогенез.

Следует подчеркнуть, что транскрипционный фактор SREBP-1c не только участвует в контроле адипогенеза, но и играет немаловажную роль в жизни зрелых адипоцитов как мастер-регулятор экспрессии генов липогенеза. Вполне вероятно, что обнаруженное сильное ингибирование экспрессии гена SREBP-1c препаратом MesoSculpt C71™ – первичный эффект от его воздействия, а уменьшение экспрессии генов липогенеза, которое будет обсуждаться ниже, лишь вторичный.

Цитофлуориметрическое исследование подтвердило вывод об ингибировании адипогенеза этим препаратом: добавление MesoSculpt C71™ одновременно с индукторами дифференцировки почти полностью блокировало образование адипоцитов, а его добавление на поздних этапах дифференцировки значительно (на 35%) уменьшало количество липидов, накопившихся в клетках к концу дифференцировки.

Исследование на электронном микроскопе показало, что при добавлении MesoSculpt C71™ в культуру на ранних этапах дифференцировки клетки сохраняют морфологические признаки, характерные для преадипоцитов (незначительное содержание липидных капель (ЛК), много митохондрий) даже к концу периода дифференцировки (рис. 2, А и Б). При добавлении препарата на завершающих этапах дифференцировки образуются клетки, более морфологически сходные с нормальными зрелыми адипоцитами, но содержание ЛК в них относительно невелико (см. рис. 2, В и Г).

Инъекционный препарат MesoSculpt™ C71 и его влияние на накопление и утилизацию липидов белой жировой ткани

В зрелых адипоцитах прогрессивное накопление липидов (липогенез) в первую очередь происходит в результате захвата жирных кислот (ЖК) из кровяного русла. Наиболее удобной формой хранения и транспортировки жирных кислот являются триглицериды (ТГ). Однако сами ТГ не способны проникать через клеточную мембрану, поэтому для переноса внутрь клетки они должны быть гидролизованы специальным ферментом липопротеинлипазой (lipoprotein lipase, LPL) [4–6]. В просвете

капилляров богатые ТГ липопротеины пищевых хиломикронов или образующихся в печени липопротеидов очень низкой плотности (VLDL) расщепляются липопротеинлипазой, а образующиеся при этом свободные ЖК транспортируются внутрь адипоцитов с помощью специального белка, транслоказы ЖК (FAT – Fatty acids translocase, известного также как CD36) (рис. 3).

Увеличение массы жировой ткани при потреблении богатой жирами пищи в значительной степени определяется именно активностью LPL и FAT. В опытах на трансгенных мышах показано, что усиление экспрессии гена LPL приводит к увеличению массы белой жировой ткани, а ее ослабление – к уменьшению [4]. При инактивации гена *FAT* наблюдается рез-

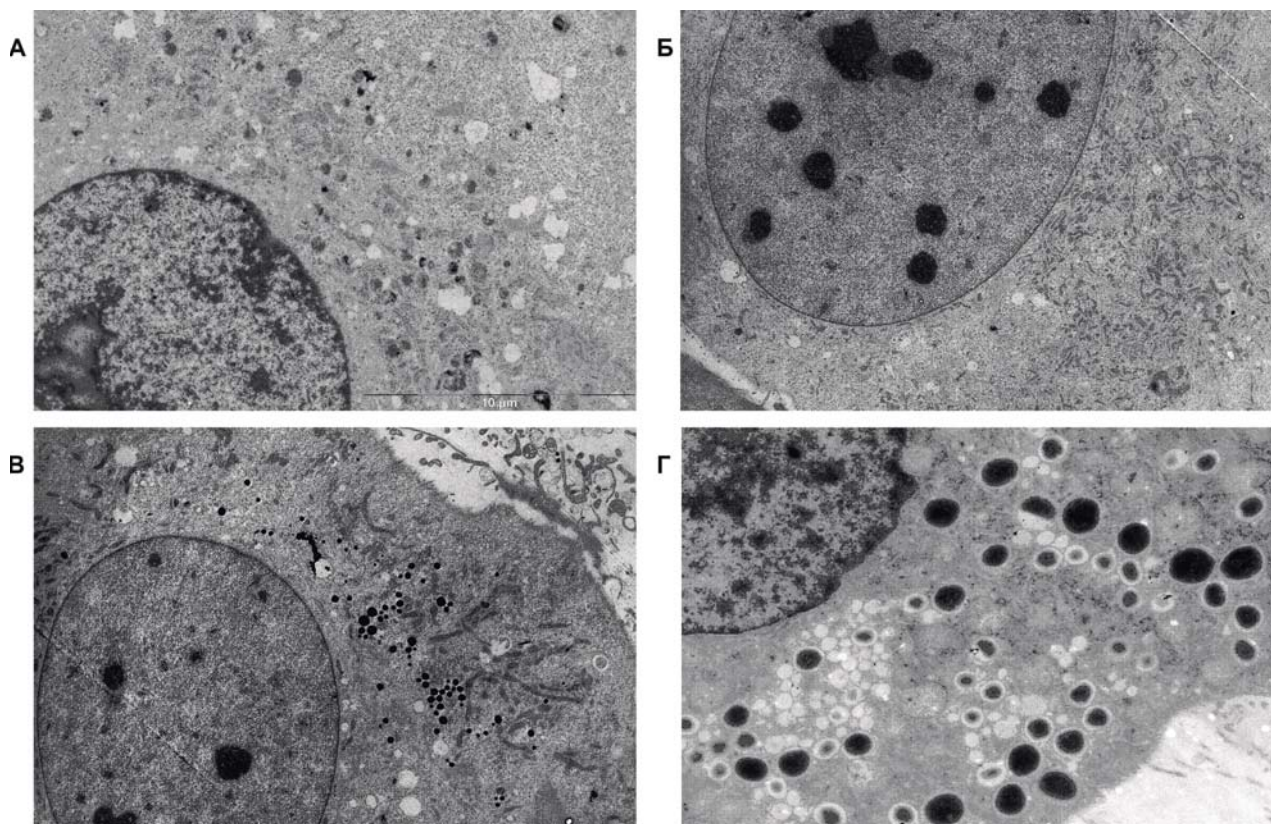


Рис. 2. Ультраструктура клеток, индуцированных к дифференцировке в разных условиях. А – фрагмент преадипоцита перед добавлением индукторов дифференцировки (немногочисленные липидные капли (ЛК) в цитоплазме (белые пятна)). Б – адипоцит после дифференцировки с добавлением MesoSculpt C71™ на ранних ее этапах (немногочисленные ЛК среди множества мелких митохондрий). В – адипоцит после дифференцировки с добавлением MesoSculpt C71™ на поздних ее этапах (содержание ЛК (белые и черные пятна округлой формы) несколько выше, чем в преадипоцитах (А), но существенно ниже, чем в контрольных адипоцитах (Г)). Г – адипоцит после дифференцировки в стандартных условиях (без добавления MesoSculpt C71™ (многочисленные и более крупные ЛК (белые и черные пятна округлой формы), редкие митохондрии)

кое возрастание концентрации свободных ЖК в плазме крови и ингибирование активности LPL. Ранее мы уже описывали сильное ингибирующее действие MesoSculpt C71™ на экспрессию гена *LPL* в адипоцитах [1]. В данной работе мы обнаружили, что примерно в такой же степени (примерно в 5 раз) препарат инги-

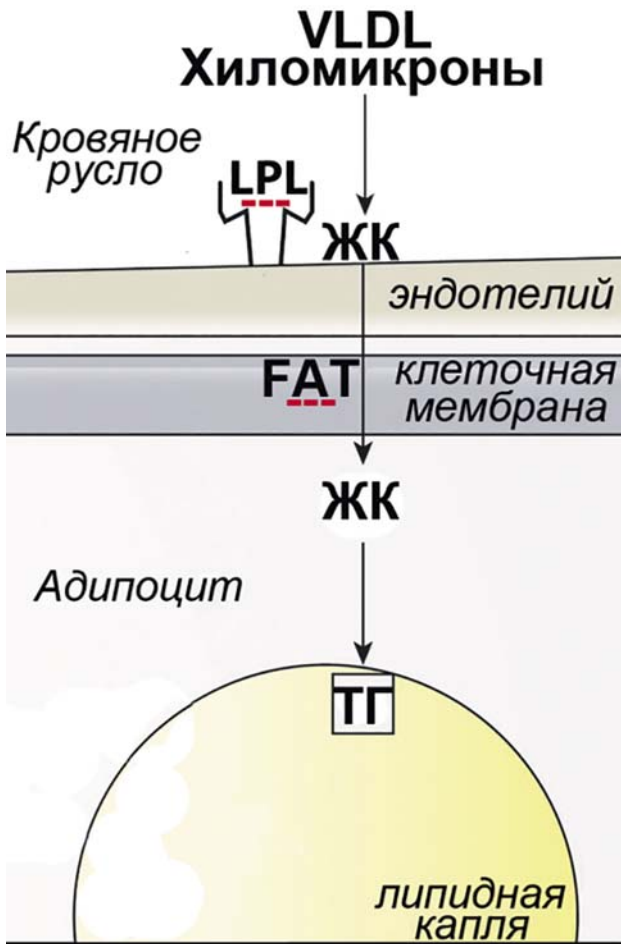


Рис. 3. Гидролиз ТГ на внутренней поверхности капилляров и транспорт ЖК в адипоциты. Молекулы липопротеинлипазы (LPL), синтезируемые в адипоцитах, транспортируются в просвет капилляров и удерживаются на их внутренних стенках с помощью специального гликопротеина. Освобождающиеся при гидролизе ТГ хиломикронов и липидов очень низкой плотности свободные ЖК транспортируются через мембрану адипоцитов белком FAT. В цитоплазме происходит их повторная этерификация и включение образующихся ТГ в липидные капли. Тремя красными минусами показано обнаруженное сильное (более чем в 5 раз) ингибирующее действие MesoSculpt C71™ на экспрессию генов *LPL* и *FAT*

бирует и экспрессию гена *FAT*. Очевидно, что общим результатом этих двух ингибирующих эффектов должно быть сильно выраженное подавление захвата адипоцитами экзогенных жирных кислот. Одним из побочных эффектов такого подавления может быть резкое усиление захвата ими глюкозы [7]. Это, в свою очередь, могло бы стимулировать синтез жирных кислот *de novo* в самих адипоцитах. Поэтому мы исследовали экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты синтеза жирных кислот (рис. 4).

Оказалось, что MesoSculpt™ C71 сильно (более чем в 5 раз) ингибирует экспрессию

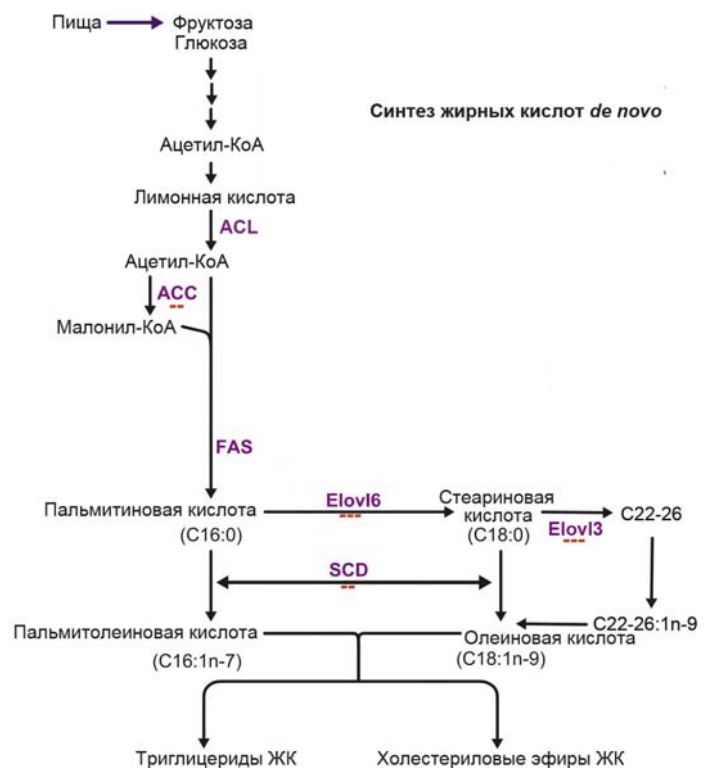


Рис. 4. Пути синтеза жирных кислот *de novo*. Пурпурным шрифтом обозначены ферменты, катализирующие последовательные этапы синтеза: ACL – ATP-citrate lyase, ACC – acetyl-CoA carboxylase, FAS – fatty acid synthase, Elov1 – elongation of very long chain fatty acids, SCD – stearoyl-CoA desaturase. Красными минусами указано обнаруженное действие MesoSculpt C71™ на экспрессию соответствующих генов: один минус – слабое ингибирование (менее чем в 2 раза), два минуса – умеренное ингибирование (в 2–5 раз), три минуса – сильное ингибирование (более чем в 5 раз)

Инъекционный препарат MesoSculpt™ C71 и его влияние на накопление и утилизацию липидов белой жировой ткани

генов *Elovl3* и *Elovl6*, умеренно – экспрессию генов *ACC* и *SCD* и не влияет на экспрессию генов *FAS* и *ACL*. Следовательно, он в значительной степени подавляет синтез насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот из внутренних источников.

Накопление больших количеств триглицеридов в адипоцитах белой жировой ткани сопровождается постепенным слиянием мелких ЛК во все более крупные (рис. 5).

Важнейшую роль в этом процессе играют белки семейства CIDE [8]. Считается, что они образуют своеобразные ТГ-проводящие каналы в местах контакта разных ЛК, через которые происходит перенос липидов из одной капли в другую. При этом направление переноса зависит от соотношения разных белков данного семейства. В белых адипоцитах преобладает белок CIDECS, обеспечивающий транс-

порт липидов из мелких ЛК в более крупные, вплоть до образования одной огромной ЛК (в унилокулярных адипоцитах белой жировой ткани диаметр ЛК может достигать 100 мкм и более). Такой вариант (максимальный объем при минимальной поверхности) оптимален для хранения липидов. В бурых адипоцитах преобладает белок CIDEA, обеспечивающий формирование мультилокулярной структуры, оптимальной для активной утилизации липидов. При индукции образования бежевых адипоцитов, например в результате адаптации к холоду, активируется экспрессия CIDEA и унилокулярная морфология белых адипоцитов сменяется мультилокулярной. В результате многократно увеличивается площадь контакта между липидными каплями и цитоплазмой, что, естественно, способствует более активному липолизу и дальнейшей утилизации освобождающихся жирных кислот. Препарат MesoSculpt™ C71 уменьшает уровень экспрессии гена *CIDECS* примерно в 4 раза, что явно должно препятствовать накоплению липидов в адипоцитах. К тому же недавно обнаружено, что белок CIDECS ингибирует экспрессию гена *ATGL* [9] и активность самой липазы *ATGL* [10]. Следовательно,

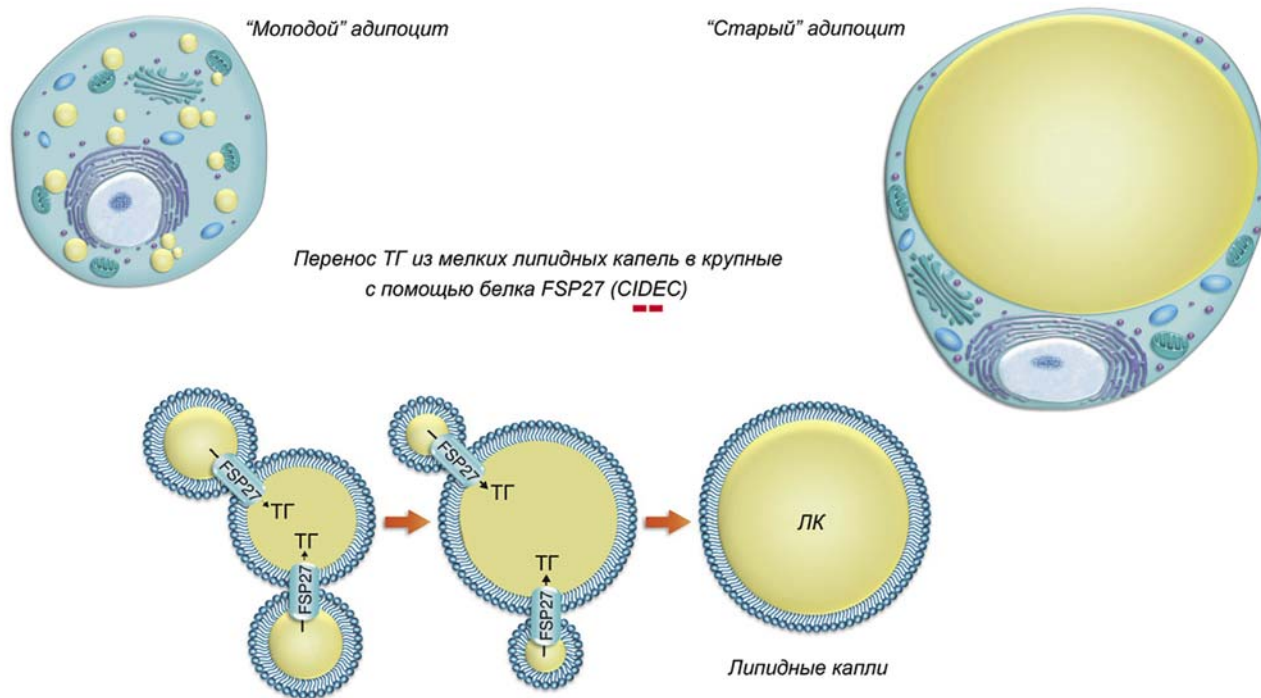


Рис. 5. Слияние липидных капель (ЛК) в результате «поглощения» мелких более крупными. FSP27 (CIDECS) – fat specific protein 27 (cell death-inducing DFF45-like effector C). Два красных минуса указывают на обнаруженное умеренное ингибирование экспрессии гена FSP27 (CIDECS) препаратом MesoSculpt™ C71

уменьшение экспрессии гена *CIDEA* должно приводить к дополнительному усилению липолиза за счет повышения активности *ATGL*.

Липолиз – процесс, противоположный липогенезу [11, 12]. При дефиците жирных кислот в активно утилизирующих их органах (миокарде, скелетной мускулатуре, печени), например вследствие продолжительного голодания, происходит мобилизация запасенных в адипоцитах жирных кислот. При повышении тонуса симпатической нервной системы – стимуляция β -адренорецепторов на поверхности адипоцитов, активация синтеза цАМФ и зависящей от него протеин-киназы А (РКА). Эта протеин-киназа фосфорилирует гормончувствительную липазу HSL и перилипины – белки, ассоциированные с ЛК (рис. 6).

Мощными активаторами липолиза являются натрийуретические пептиды. Они действуют через рецептор натрийуретических

пептидов А, обладающий гуанилат-циклазной активностью. В результате происходит цГМФ-зависимая активация протеин-киназы G (РКГ) и активирующее фосфорилирование липазы HSL и перилипинов. Концентрация натрийуретических пептидов в крови повышается после физических нагрузок. Повышение концентрации инсулина, например после приема пищи, наоборот, ингибирует липолиз. Инсулин активирует фосфодиэстеразу 3В, гидролизующую цАМФ, и тем самым подавляет РКА-зависимое фосфорилирование. Активность протеин-киназы G подавляется в результате гидролиза цГМФ фосфодиэстеразой 5, но факторы, активирующие эту фосфодиэстеразу, пока не идентифицированы.

Расщепление каждой молекулы триглицеридов происходит на поверхности липидной капли последовательно тремя липазами – ATGL, HSL и MGL. В результате образуются

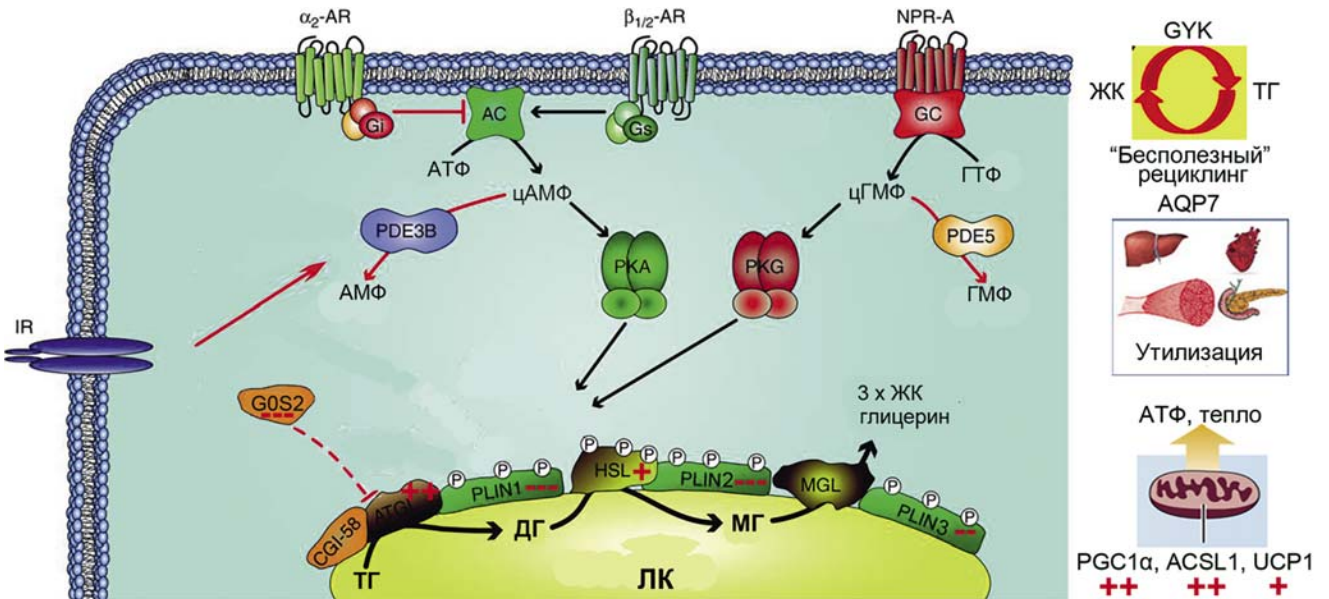


Рис. 6. Регуляция липолиза в адипоцитах белой жировой ткани. Черные стрелки – стимулирующие липолиз влияния, красные – ингибирующие. Справа показаны основные пути утилизации ЖК. AR – адренорецепторы; NPR-A – рецептор натрийуретических пептидов типа А; IR – рецептор инсулина; Gs – G-белок стимулирующего типа; Gi – G-белок ингибирующего типа; AC – аденилат-циклаза; GC – гуанилат-циклаза; PDE – фосфодиэстераза; PKA – протеин-киназа А; PKG – протеин-киназа G; ТГ – триглицериды; ДГ – диглицериды; МГ – моноглицериды; ATGL – ТГ липаза адипоцитов (adipose TG lipase); HSL – гормончувствительная липаза (hormone-sensitive lipase); MGL – МГ липаза (monoglyceride lipase); PLIN – перилиптин; CGI-58 – comparative gene identification-58; GOS2 – G0/G1 switch 2; GYK – глицерол-киназа; AQP7 – аквапорин 7; PGC1 α – peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ; ACSL1 – ацил-КоА-синтетаза 1 (acyl-CoA synthetase-1); UCP1 – разобщающий белок 1 (uncoupling protein 1). Три красными минусами показано сильное ингибирование *MesoSculpt™ C71* экспрессии генов *GOS2*, *PLIN1* и *PLIN2*, двумя – умеренное ингибирование гена *PLIN3*, красными плюсами – стимулирующее действие *MesoSculpt™ C71* на экспрессию соответствующих генов: один плюс – слабая стимуляция (менее чем в 2 раза), два – умеренная (в 2–5 раз)

Инъекционный препарат MesoSculpt™ C71 и его влияние на накопление и утилизацию липидов белой жировой ткани

▶ три молекулы ЖК и одна молекула глицерина. Краткосрочная регуляция активности этих липаз осуществляется путем фосфорилирования HSL и перилипинов, в результате которого изменяется сродство ATGL к регуляторным белкам G0S2 и CGI-58, а также доступность поверхности ЛК для липаз и их каталитическая активность. Ключевую роль в этом процессе играет перилипин 1. В отсутствие стимуляции нефосфорилированные молекулы перилипина 1 прочно ассоциированы с белком CGI-58 – мощным коактиватором ATGL. Сама ATGL при этом прочно ассоциирована с корепрессорным белком G0S2 и каталитически неактивна. Фосфорилирование перилипина 1 нарушает его ассоциацию с коактиватором CGI-58, в результате чего последний освобождается и, вытесняя корепрессор G0S2, активирует липазу ATGL. При этом происходит активация и всего липолиза в целом, поскольку именно отщепление первой молекулы ЖК от молекулы ТГ является лимитирующей стадией процесса [10].

Длительная адаптация белой жировой ткани к изменившимся условиям внешней или внутренней среды (недостатку пищи, продолжительному охлаждению, избыточным физическим нагрузкам) достигается путем устойчивых изменений в активности генов. MesoSculpt™ C71 умеренно (примерно в 2 раза) стимулирует экспрессию гена *ATGL*, несколько слабее (в 1,7 раза) – экспрессию гена *HSL*, и не влияет на экспрессию гена *MGL*. Таким образом, наблюдается стимуляция липолиза ТГ.

Еще более выраженной эта стимуляция становится благодаря сильному (более чем в 5 раз) ингибированию экспрессии генов перилипина 1 и корепрессорного белка G0S2. В опытах на трансгенных мышцах показано, что выключение (knockout) гена *PLIN1* приводит к сильно выраженному уменьшению массы белой жировой ткани из-за повышения базового уровня липолиза [12]. Аналогично выключение гена *G0S2* приводит к выраженной стимуляции [13], а его избыточная экспрессия – к подавлению липолиза [14]. Таким образом, умеренная стимуляция препаратом MesoSculpt™ C71 экспрес-

сии генов *ATGL* и *HSL*, наряду с подавлением экспрессии генов двух главных ингибиторов *ATGL*, должна весьма значительно стимулировать липолиз ТГ в адипоцитах белой жировой ткани.

MesoSculpt™ C71 вызывает также существенное (более чем в 5 раз) подавление экспрессии гена *PLIN2* и умеренное (примерно в 2 раза) – гена *PLIN3*. Показано, что в культуре клеток избыточная экспрессия гена *PLIN2* приводит к подавлению липолиза ТГ на поверхности ЛК и уменьшает доступность поверхности ЛК для *ATGL* [15]. Инактивация гена *PLIN2* у мышей делает их резистентными к ожирению, вызванному богатой жирами пищей, что коррелирует с увеличением доли бежевых адипоцитов в подкожной жировой ткани [16]. Перилипины 2 и 3 могут взаимно компенсировать недостаток друг друга на поверхности ЛК, а уменьшение их количества способствует доступу *ATGL* к поверхности ЛК и активации липолиза [17]. Механизмы этого воздействия пока мало изучены, но какими бы они ни были, ингибирование экспрессии генов *PLIN2* и *PLIN3* препаратом MesoSculpt™ C71 должно дополнительно стимулировать липолиз ТГ.

Перилипин 4 в больших количествах присутствует в белой жировой ткани и в меньших – в скелетных мышцах и сердце. В бурой жировой ткани он практически отсутствует [18]. Для перилипина 5 характерна противоположная локализация: его много в клетках с высокой окислительной активностью (в бурой жировой ткани, сердце, скелетных мышцах, печени). При липолитической стимуляции адипоцитов агонистом β-адренорецепторов изопротеренолом наблюдается фрагментация ЛК на множество микрокапель, с поверхностью которых ассоциирован перилипин 4 [19]. И хотя функциональное значение этой ассоциации остается неясным, фрагментация ЛК как таковая, очевидно, способствует активации липолиза ТГ, увеличивая отношение площади поверхности ЛК, доступной для липаз, к их объему.

MesoSculpt™ C71 заметно (в 4–5 раз) увеличивает уровень экспрессии гена *PLIN4*, что, вероятно, приводит к стимуляции липолиза. В отличие от перилипина 4 и аналогично перилипину 1 в белой жировой ткани перилипин 5 в экспрессирующих его клетках препятствует липолизу ТГ в базовом нефосфорилированном состоянии, но этот барьер исчезает при его фосфорилировании протеин-киназой А [20,

21]. В молекуле перилипина 5 обнаружен участок связывания с митохондриями, обеспечивающий прямой физический контакт между этими органеллами и ЛК [22]. Вполне возможно, что именно эта особенность обуславливает избирательную экспрессию перилипина 5 в бурых адипоцитах и других клетках с высокой оксидативной активностью.

MesoSculpt™ C71 незначительно (примерно в 1,3 раза) повышает уровень экспрессии гена *PLIN5*. По-видимому, это отражает индуцированную препаратом трансдифференцировку части белых адипоцитов в бежевые и объясняет наблюдавшуюся нами с помощью электронного микроскопа тесную ассоциацию ЛК с митохондриями под действием препарата (рис. 7).

Один из главных молекулярных маркеров активного образования новых митохондрий – белок *PGC1α* [23]. Мы наблюдали умеренную (примерно в 2 раза) стимуляцию экспрессии

гена *PGC1α* препаратом MesoSculpt™ C71, что явно свидетельствует об активации биогенеза (образования) митохондрий. Функциональным значением такой активации, по-видимому, является β-окисление ЖК, освобождающихся при индуцированном липолизе ТГ. Такое предположение естественным образом объясняет наблюдающуюся тесную ассоциацию между ЛК и митохондриями в обработанных препаратом адипоцитах. Оно подтверждается также наблюдавшейся нами стимуляцией (примерно в 2 раза) экспрессии гена *ACSL1*, которая, как известно, коррелирует с интенсивностью процесса β-окисления ЖК [24]. Таким образом, окисление ЖК в митохондриях служит как минимум одним из способов утилизации ЖК, освобождающихся из ЛК в результате активации препаратом MesoSculpt™ C71 процессов липолиза.

Известно, что в митохондриях большинства клеток, в том числе адипоцитов белой жировой

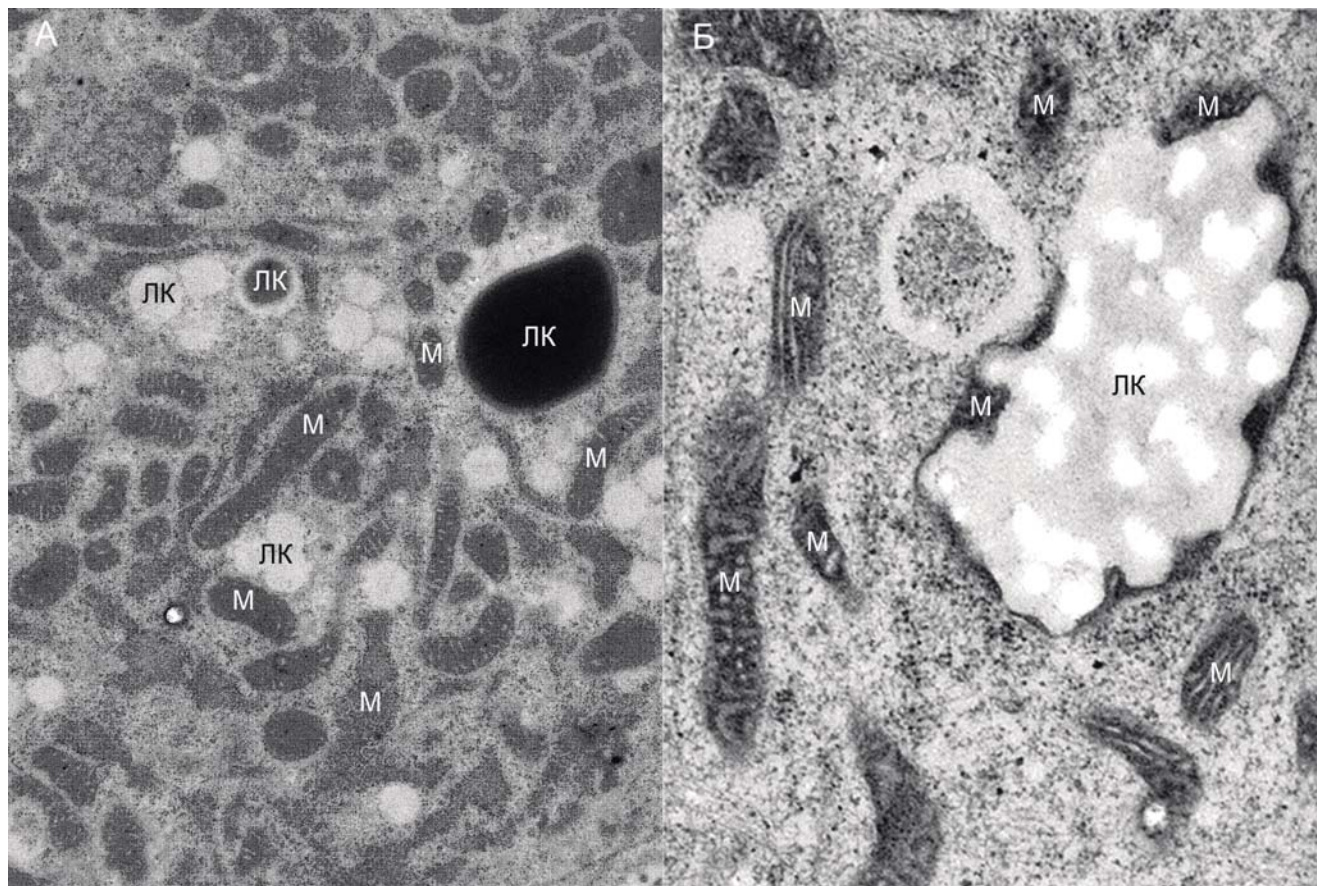


Рис. 7. Тесная физическая ассоциация ЛК с митохондриями под действием MesoSculpt™ C71. А – ЛК окружены множеством митохондрий (М). Различные размеры и окраска ЛК и митохондрий обусловлены их варьирующей ориентацией в трехмерном пространстве клеток по отношению к плоскости среза. Б – ЛК, окруженная митохондриями, при большем увеличении

Инъекционный препарат MesoSculpt™ C71 и его влияние на накопление и утилизацию липидов белой жировой ткани

ткани, окисление ЖК сопряжено с синтезом АТФ, в то время как в адипоцитах бурой жировой ткани и подобных им бежевых адипоцитах окисление ЖК происходит без сопутствующего синтеза АТФ, а освобождающаяся при этом энергия рассеивается в виде тепла [25]. Белок UCP1, ответственный за разобщение процессов окисления и синтеза АТФ, – главный молекулярный маркер бурых и бежевых адипоцитов. Мы обнаружили, что ген *UCP1* очень слабо экспрессируется в контрольных адипоцитах, а при добавлении MesoSculpt™ C71 уровень его экспрессии возрастает в 1,3–1,8 раза, то есть в меньшей степени, чем для генов *PGC1α* и *ACSL1*. Логично предположить, что наблюдаемая активация β-окисления ЖК происходит как за счет увеличения количества митохондрий в самих белых адипоцитах, так отчасти и за счет трансдифференцировки какой-то части белых адипоцитов в бежевые.

Наиболее эффективно, если говорить о «сжигании» избыточных жиров, окисление ЖК в бежевых адипоцитах, поскольку при этом высвобождаемая энергия не запасается в виде молекул АТФ (которые в принципе могут быть использованы и для синтеза новых молекул ТГ), а бесследно рассеивается в форме тепла. Тем не менее и обычная утилизация ЖК в собственных митохондриях белых адипоцитов может быть вполне эффективным способом уменьшения массы белой жировой ткани [26].

Наконец, нельзя не упомянуть еще о двух возможных способах утилизации освобождающихся при липолизе молекул ЖК.

Первый связан с повторной этерификацией ЖК и возвращением образующихся при этом ТГ в ЛК. На первый взгляд результат такого процесса все возвращает в исходное состояние, поэтому в англоязычной литературе он обозначается как «бесполезный» (*futile*) цикл. В действительности же реэтерификация ЖК требует затрат довольно значительных количеств АТФ и в этом смысле вовсе не является бесполезной. Лимитирующим фактором в «бесполезном» цикле служит активность фермента глицерол-киназы (ГК). Оказалось, что MesoSculpt™ C71 не изменяет экспрессии

гена *ГК*, поэтому данный вариант утилизации ЖК, скорее всего, не играет существенной роли в механизмах его липолитического действия.

Второй возможный вариант утилизации ЖК – их освобождение из адипоцитов в кровоток и доставка в другие органы. Оба процесса в значительной степени зависят от экспрессии гена *AQP7*, кодирующего мембранный белок водно-глицеринового канала. При низкой экспрессии этого гена образующиеся при липолизе молекулы глицерина в основном остаются внутри адипоцита, что приводит к активации утилизации ЖК и глицерина по пути «бесполезного» цикла [27]. Мы не наблюдали скольких-нибудь существенных изменений в уровне экспрессии гена *AQP7* под действием MesoSculpt™ C71. Следовательно, эффективность утилизации ЖК за счет реэтерификации и экспорта остается на базовом уровне. Это, в свою очередь, означает, что основным способом утилизации ЖК при действии MesoSculpt™ C71 является их β-окисление в митохондриях белых и бежевых адипоцитов.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты описанного исследования подтверждают позиционирование инъекционного препарата MesoSculpt™ C71 как средства, уменьшающего массу подкожных жировых отложений. При этом механизмы действия препарата множественные. Одним из наиболее выраженных является ингибирование захвата ЖК из пищевых источников за счет подавления активности генов липопротеин-липазы (LPL) и транслоказы ЖК (FAT). Этот механизм, очевидно, наиболее важен при богатой жирами диете. В случае избыточного потребления углеводов на первый план выходит ингибирование активности генов, кодирующих ферменты синтеза ЖК *de novo*. В обоих случаях увеличению жировой массы препятствует также ингибирование процессов адипогенеза.

Наиболее выраженное воздействие, ответственное за уменьшение массы ранее накопленных жиров, – это стимуляция процессов липолиза ТГ в адипоцитах белой жировой ткани и последующего β-окисления освобождающихся ЖК в митохондриях, тесно ассоциированных с ЛК. Стимуляция липолиза и последующей утилизации ЖК, в свою очередь, также дости-

гаются благодаря нескольким механизмам. Во-первых, благодаря стимуляции собственно расщепления ТГ в результате увеличения экспрессии генов липазы ТГ (*ATGL*) и гормончувствительной липазы ДГ (*HSL*), а также их «помощника» – перилипина 4. Во-вторых, благодаря ингибированию генов, кодирующих белки, препятствующие липолизу (*G0S2* и перилипины 1–3). Наконец, мы обнаружили активизацию β -окисления освобождающихся в результате липолиза ЖК в митохондриях. При этом наблюдается увеличение числа митохондрий в самих адипоцитах белой жировой ткани и в какой-то степени трансдифференцировка белых адипоцитов в бежевые, способные наиболее эффективно «сжигать» ЖК без сопутствующего образования АТФ. Судя по соотношению активности генов, кодирующих маркеры биогенеза митохондрий (*PGC1 α*), β -окисления ЖК в митохондриях (*ACSL1*) и образования бежевых адипоцитов (*UCP1*, *PLIN5*), β -окисление ЖК в собственных митохондриях белых адипоцитов – преобладающий путь их утилизации, а их «сжигание» в бежевых адипоцитах – вспомогательный.

Следует оговориться, однако, что в наших экспериментах воздействие препарата на клетки было однократным и непродолжительным. Вполне вероятно, что при более длительном или повторном действии препарата MesoSculpt™ C71 вклад альтернативного пути утилизации ЖК, связанного с образованием бежевых адипоцитов, будет более весомым. По своей природе процесс трансдифференцировки белых адипоцитов в бежевые не что иное, как эпигенетическое репрограммирование. Это означает, что возникшие бежевые адипоциты останутся таковыми и после окончания действия препарата. При его повторном действии количество бежевых адипоцитов будет увеличиваться, а следовательно, будет увеличиваться и их удельный вес в общем балансе утилизации ЖК.

Литература

1. Ашаткин ВВ, Кутуева ЛИ, Ванюшин БФ. Молекулярно-генетические механизмы действия препарата MesoSculpt™ C71 на адипоциты белой жировой ткани. *Инъекционные методы в косметологии*, 2015;1:68–75.
2. Lee Y-H, Chen S-Y, Wiesner RJ, Huang Y-F. Simple flow cytometric method used to assess lipid accumulation in fat cells. *J Lipid Res*, 2004;45:1162–1167.
3. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 2012;23:56–64.
4. Voshol PJ, Rensen PCN, van Dijk KW, et al. Effect of plasma triglyceride metabolism on lipid storage in adipose tissue: Studies using genetically engineered mouse models. *Biochim Biophys Acta*, 2009;1791:479–485.
5. Bartelt A, Weigelt C, Cherradi ML, et al. Effects of adipocyte lipoprotein lipase on de novo lipogenesis and white adipose tissue browning. *Biochim Biophys Acta*, 2013;1831:934–942.
6. Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Develop*, 2013;27:459–484.
7. Putri M, Syamsunarno MRAA, Isoa T, et al. CD36 is indispensable for thermogenesis under conditions of fasting and cold stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015;457:520–525.
8. Barneda D, Frontini A, Cinti S, Christian M. Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the «browning» of white adipose tissues. *Biochim Biophys Acta*, 2013;1831:924–933.
9. Singh M, Kaur R, Lee MJ, et al. Fat-specific protein 27 inhibits lipolysis by facilitating the inhibitory effect of transcription factor Egr1 on transcription of adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem*, 2014;289: 4481–14487.
10. Grahn THM, Kaur R, Yin J, et al. Fat-specific protein 27 (FSP27) interacts with adipose triglyceride lipase (ATGL) to regulate lipolysis and insulin sensitivity in human adipocytes. *J Biol Chem*, 2014;289:12029–12039.
11. Arner P, Langin D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 2014;25:255–262.
12. Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JOL, et al. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol*, 2014;52:R199–R222.
13. Zhang X, Xie X, Heckmann BL, et al. Targeted disruption of G0/G1 switch gene 2 enhances adipose lipolysis, alters hepatic energy balance, and alleviates high-fat diet-induced liver steatosis. *Diabetes*, 2014;63:934–946.
14. Heckmann BL, Zhang X, Xie X, et al. Defective adipose lipolysis and altered global energy metabolism in mice with adipose overexpression of the lipolytic inhibitor G0/G1 switch gene 2 (*G0S2*). *J Biol Chem*, 2014;289:1905–1916.
15. Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, et al. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res*, 2007;48:2751–2761.
16. McManaman JL, Bales ES, Orlicky DJ, et al. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J Lipid Res*, 2013;54:1346–1359.

Инъекционный препарат MesoSculpt™ C71 и его влияние на накопление и утилизацию липидов белой жировой ткани

- ▶ 17. Bell M, Wang H, Chen H, et al. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: Abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes*, 2008;57:2037–2045.
18. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*, 2009;1791:419–440.
19. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2004;279:46835–46842.
20. Wang H, Bell M, Sreenivasan U, et al. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem*, 2011;286:15707–15715.
21. Pollak NM, Jaeger D, Kolleritsch S, et al. The interplay of protein kinase A and perilipin 5 regulates cardiac lipolysis. *J Biol Chem*, 2015;290:1295–1306.
22. Wang H, Sreenivasan U, Hu H, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res*, 2011;52:2159–2168.
23. Liang H, Ward WF. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*, 2006;30:145–151.
24. Ellis JM, Li LO, Wu P-C, et al. Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward β -oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metabol*, 2010;12:53–64.
25. Kajimura S, Saito M. A new era in brown adipose tissue biology: Molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annu Rev Physiol*, 2014;76:225–249.
26. Flachs P, Rossmeis M, Kuda O, Kopecky J. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: A key to lean phenotype. *Biochim Biophys Acta*, 2013;1831:986–1003.
27. Hibuse T, Maeda N, Funahashi T, et al. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005;102:10993–10998.