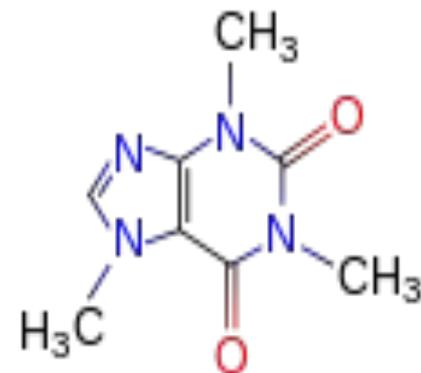




Свободные жирные кислоты и кальциевый гомеостаз скелетно-мышечных клеток.

Алексеева О.М.

*Институт Биохимической физики
РАН им. Н.М. Эмануэля, Москва*



Кофеин

Исследовано действие свободных жирных кислот (СЖК) на функции основного кальциевого депо скелетных мышц теплокровных животных – саркоплазматического ретикулума.

Присутствие кофеина и ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} меняет воздействие СЖК на проницаемость мембран ретикулума.

СЖК действуют, как хаотропные агенты, разрушая упорядоченный бислой мембран.

Sarzala M, Drabikowski W. Life Sciences. 1969. "Free fatty acids as a factor modifying properties of fragmented SR during aging"

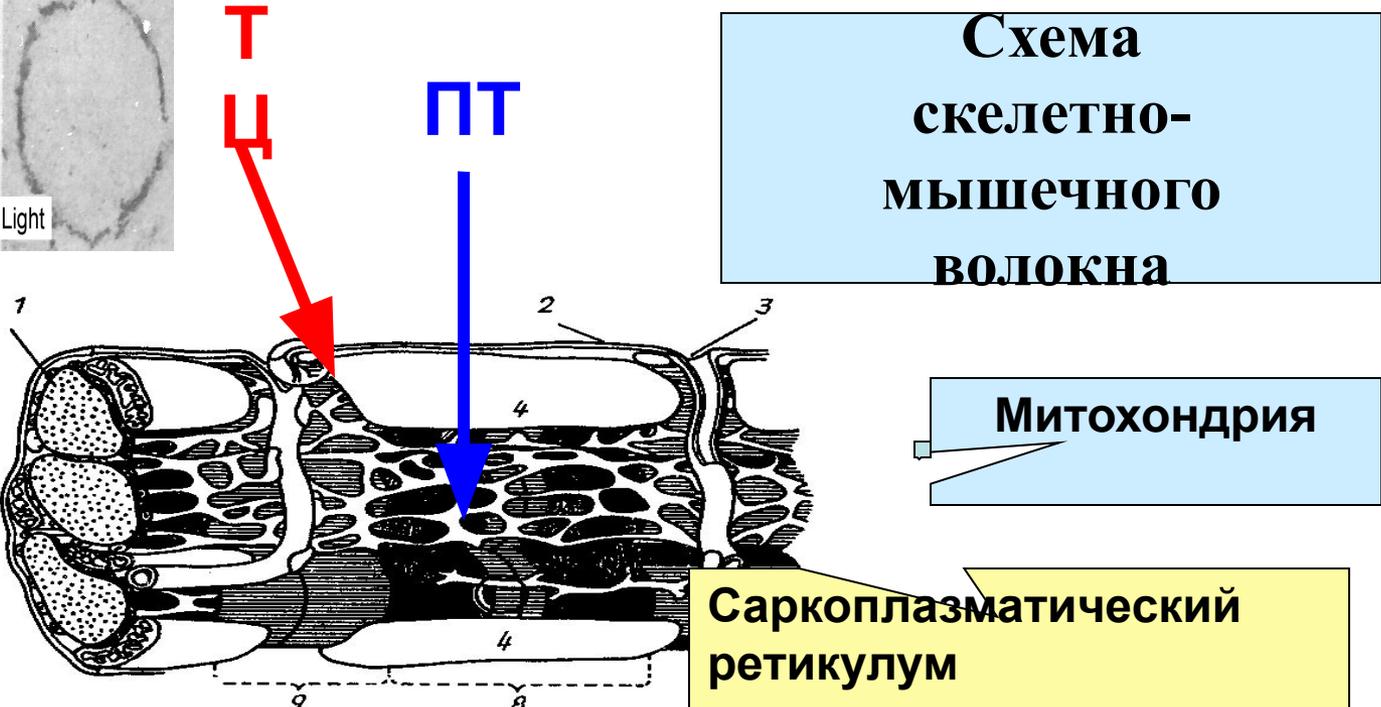
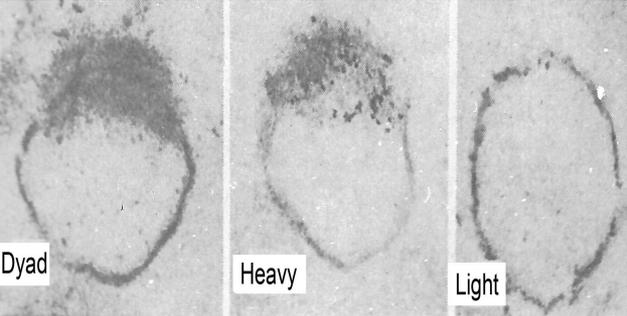


Какáо,
Шоколадное
дéрево
(*Theobrōma
cascāo*)

Действие СЖК и кофеина на основное Ca^{2+} -депо в скелетных мышцах тестировали на фрагментах саркоплазматического ретикулума (ФСР).

ФСР выделяли из белых скелетных мышц кролика . Это быстрые мышцы, получающие энергию за счет быстрых реакций гликолиза. Они содержат немного митохондрий по сравнению с красными и смешанными мышцами.

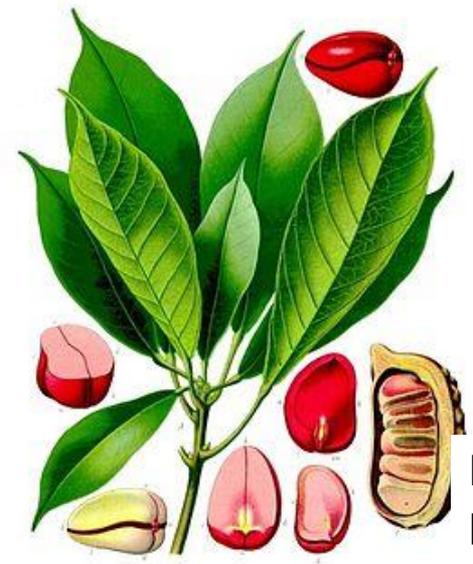
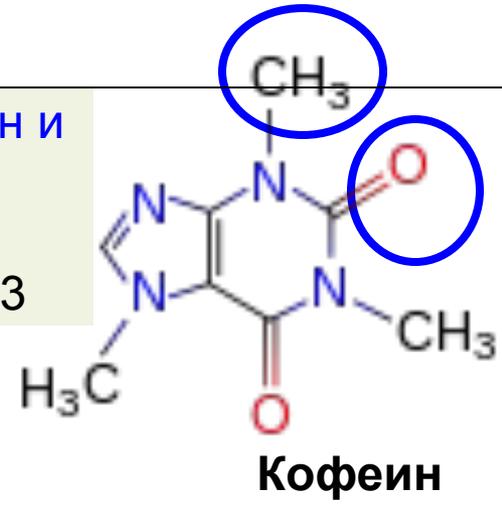
Терминальные отделы ретикулула получали, как тяжелую фракцию ФСР (ТЦ). Продолговатые трубочки, как – легкую фракцию ФСР (ПТ).



Для моделирования работы СР применяли экзогенный стимулятор – кофеин, наиболее известный среди метилксантинов растительного происхождения. Содержится в плодах кофейного дерева, чайных листьях, мате, гуаране, коле.

Стимулятор двигательной и мыслительной активности.

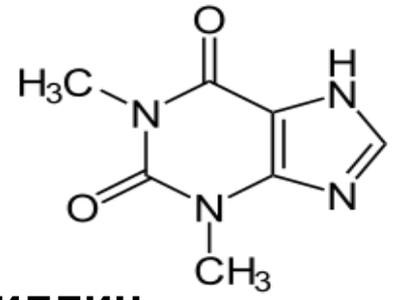
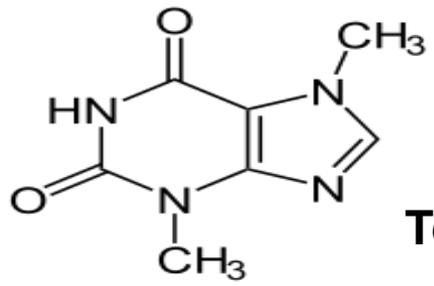
Метилксантины – кофеин и его природные аналоги: теобромин и теофиллин. Отмечены значимые для проявления эффекта кофеина и его аналогов на освобождение Ca^{2+} из ФСРтц боковые группы –карбонильная в положении 2 и метильная в 3



Чайный куст или камелия китайская

Какáо, Шоколадное дéрево (*Theobrōma cacão*)

Кола (*Cola*) — род растений семейства Малтвовые. Вечнозелёные деревья высотой до 20 м.



Mutations in genes encoding RyRs cause various muscle and heart diseases. RyR channels are activated by Ca^{2+} , the actual mechanism of Ca^{2+} binding remains unknown.

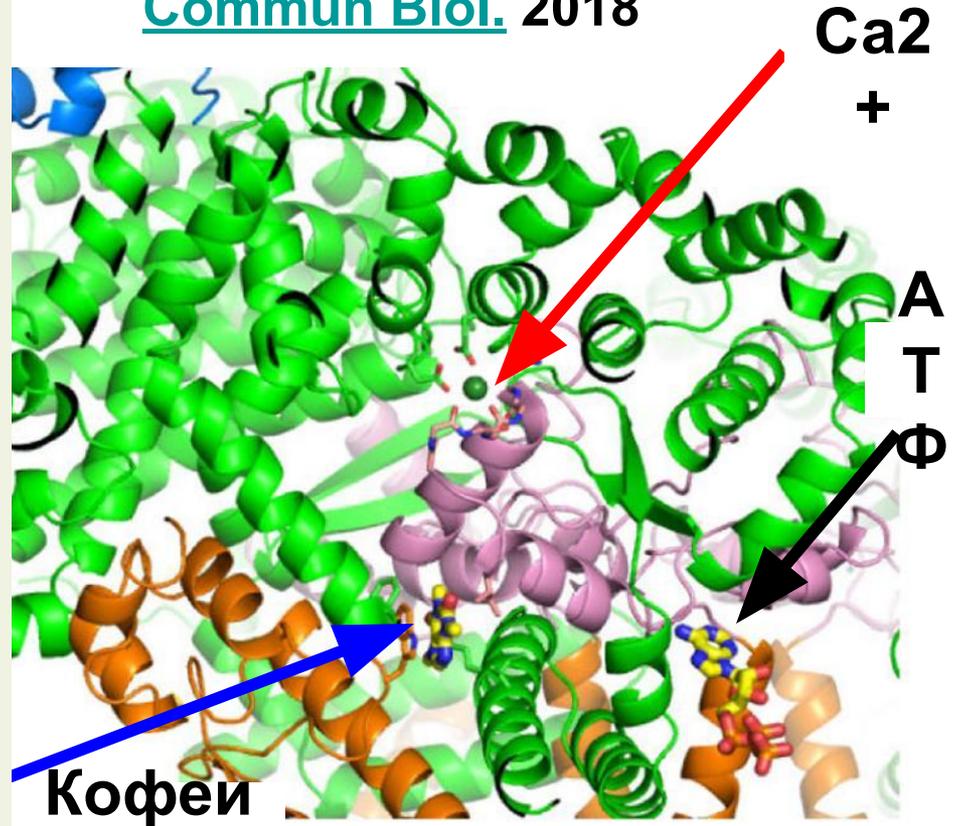
The molecular basis of Ca^{2+} binding to RyRs for channel activation:

RyR1 and RyR2 carrying mutations in putative Ca^{2+} and caffeine-binding sites were functionally analysed. The results were interpreted with respect to recent near-atomic resolution RyR1 structures in various ligand states.

Tryptophan residue in caffeine-binding site controls the structure of Ca^{2+} -binding site to regulate Ca^{2+} sensitivity.

Murayama, [Ogawa](#) [Commun Biol.](#) 2018 - reveal the initial step of RyR channel activation by Ca^{2+} and explain the molecular mechanism of Ca^{2+} Sensitization by caffeine and disease-causing mutations.

A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates Ca^{2+} sensitivity. Murayama, [Ogawa](#) [Commun Biol.](#) 2018



[Commun Biol.](#) 2018 - reveal the initial

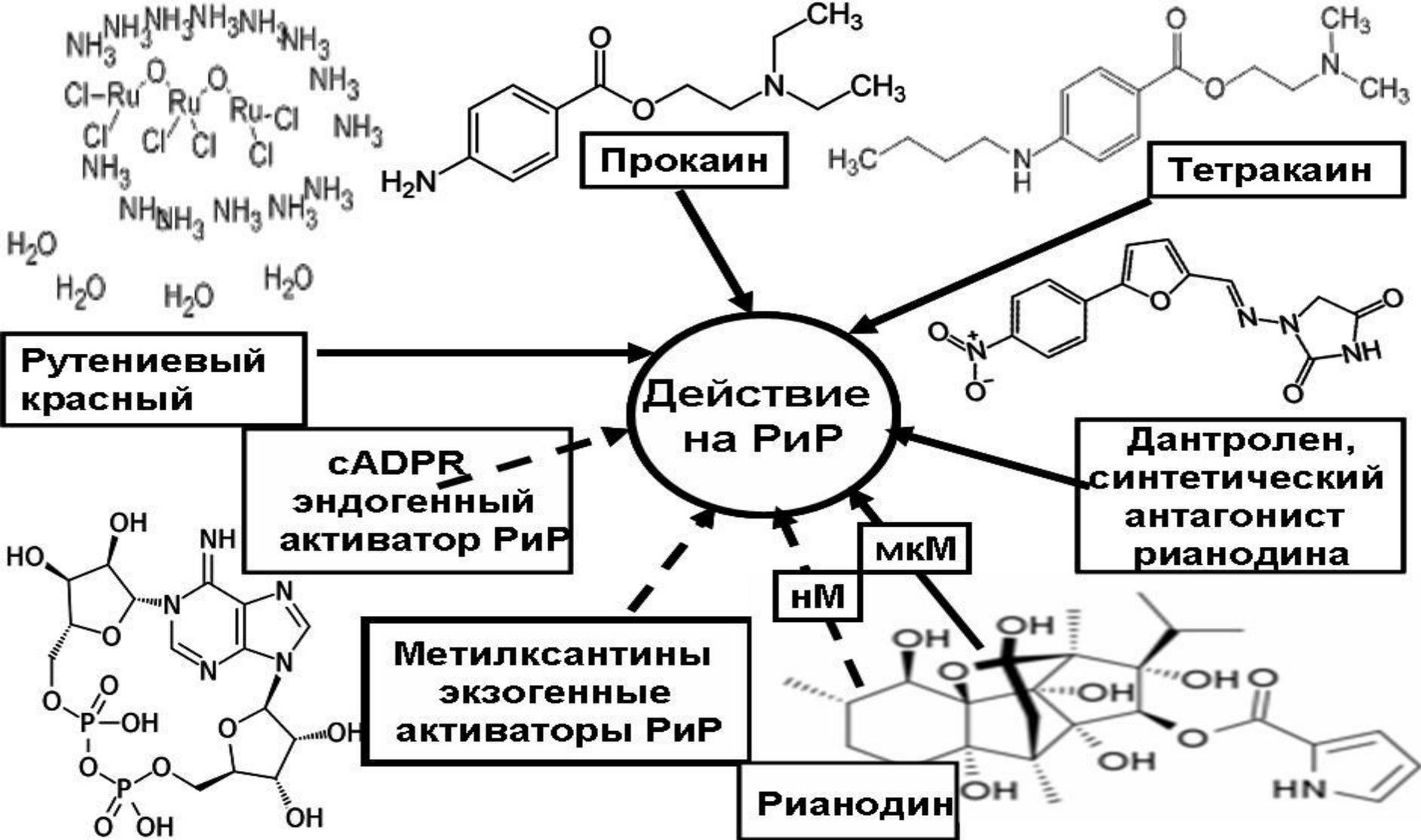
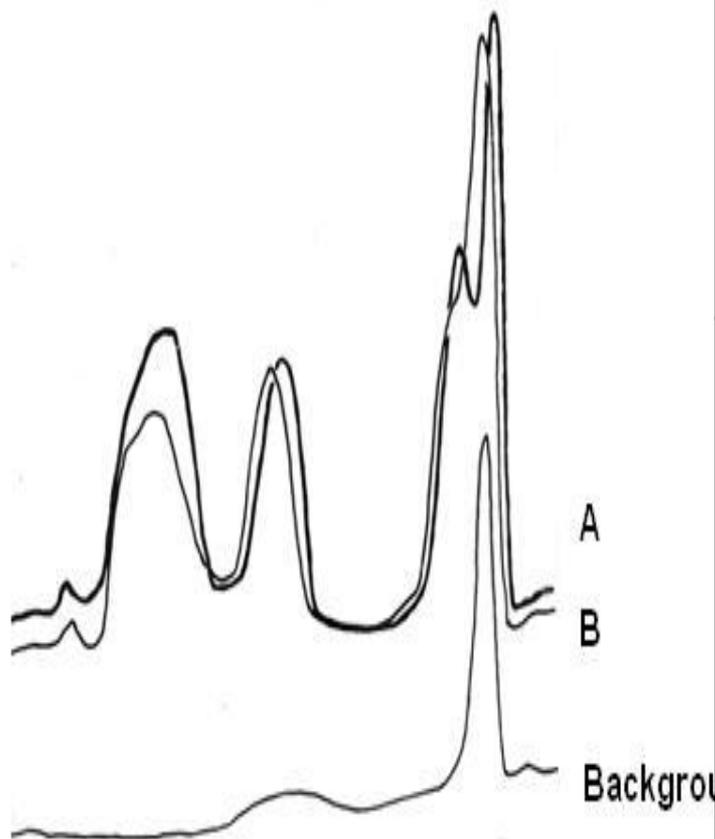


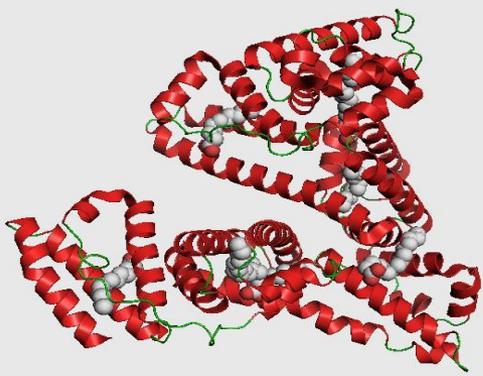
Схема действия аналогов и антагонистов кофеина на активацию освобождения Ca^{2+} из ФСРтц.

Стрелками указано действие на Р1Р – сплошные линии ингибирование, прерывистые линии – активирование.

Проведенный нами анализ содержания липидов показал, что препараты фрагментированных продолговатых трубочек и терминальных цистерн содержали большое количество свободных жирных кислот



липиды	Препараты фрагментированного саркоплазматического ретикулула	
	ФСР терминальных цистерн	ФСР продолговатых трубочек
Кислые фосфолипиды	6,3%	5,05
фосфатидилэтноламин	22,1%	25,2%
фосфатидилхолин	43%	35,6%
Свободные жирные кислоты	19,4%	20,1%
Нейтральные липиды	9,1%	14,1%



Сывороточный альбумин человека (САЧ) -1 цепь, 584 аминокислотных остатка, МВ 69 000, 3 повтора гомологичных областей — 3 домена, содержащих 6 дисульфидных мостиков. В водной среде САЧ связывает липиды в гидрофобных областях.

- Для отмывания мембран от СЖК, загрязняющих или инкорпорированных в бислой ФСР, и влияющих на пассивную проницаемость бислоя для ионов Ca^{2+} . использовали **САЧ**.
- САЧ был освобожден от адсорбированных гидрофобных веществ при обработке водной взвесью фармацевтического активированного угля при низких значениях рН (4-5), что позволило «развернуть» молекулу САЧ.
- Удаление осадка **угля** при центрифугировании, и последующее восстановление рН до физиологических значений (6,5-7,0) привело к получению раствора САЧ, способного связывать большое количество гидрофобных молекул. Раствором САЧ экстрагировали СЖК из мембран двух фракций ФСР в физиологических условиях.
- Обработка ФСР увеличивала сопряженность Ca^{2+} -насоса Ca^{2+} -АТРаза, снижала пассивную проницаемость ФСР.
- Также происходило усиление активации выхода ионов Ca^{2+} через Ca^{2+} -канал ФСР терминальных цистерн

Эффективность накопления ионов Ca^{2+} ФСР измеряли с помощью потенциометрического метода - pH-метрического метода.

Регистрировали снижение pH при гидролизе АТФ Ca^{2+} -АТФазой (SERCA2). Это ионный насос, закачивающий ионы Ca^{2+} во внутреннее пространство ФСР **против градиента концентрации**.

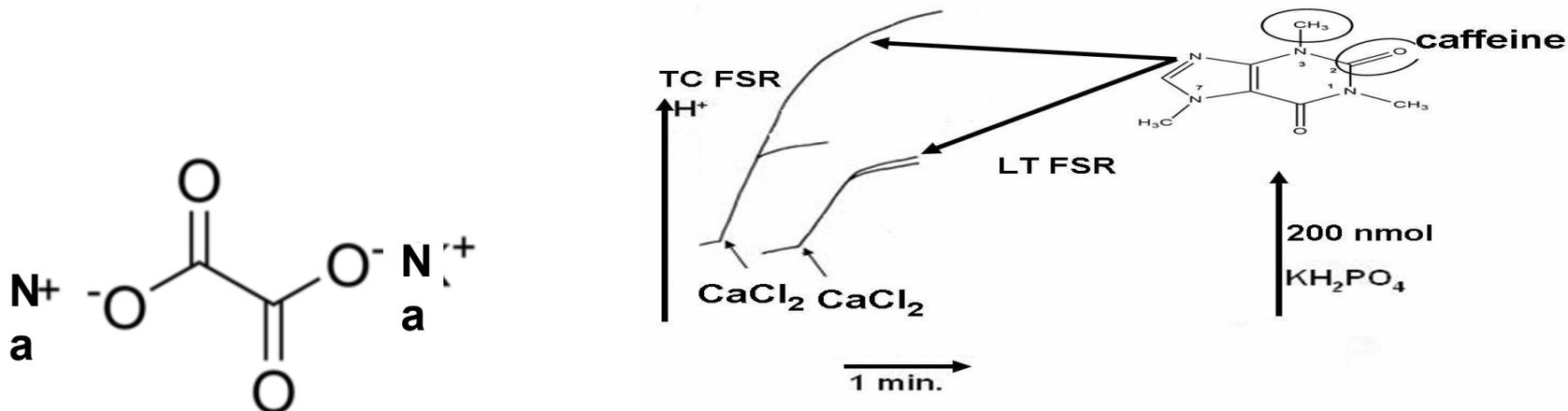
Эффективность работы Ca^{2+} -АТФазы выражается величиной $\text{Ca}/\text{АТФ}$, т.е. соотношением количества перенесенного через мембрану СР ионного Ca^{2+} к количеству расщепленного Ca^{2+} -АТФазой АТФ.

Максимальная величина **$\text{Ca}/\text{АТФ}$** теоретически равна 2.

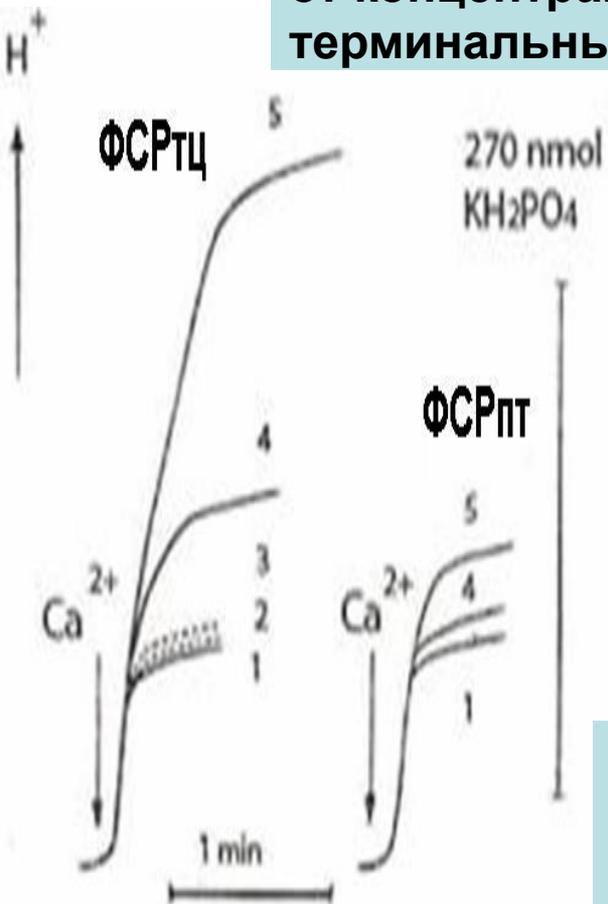
Но $\text{Ca}/\text{АТФ}$ всегда ниже, т.к. **существует пассивная утечка** через мембрану ФСР, преимущественно обусловленная присутствием свободных жирных кислот, пертурбирующими бислоем ФСР.

Для измерения **$\text{Ca}/\text{АТФ}$** в 4 мл среды: 5мМ оксалат Na, 0,1М NaCl, 4 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ имидазол pH 6,8 37о С, при интенсивном перемешивании добавляли 1,9мМ АТФ и 2-5 мкг ФСР.

Накопление оксалата кальция внутри ФСР инициировали 80 нмоль CaCl_2 .



Зависимость эффективности транспорта Ca^{2+} $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ от концентрации Mg^{2+} и свободных жирных кислот в мембранах терминальных цистерн саркоплазматического ретикулула



ФСР	1 мМ Mg^{2+}		4 мМ Mg^{2+}	
	-	5 мМ кофеина	-	5 мМ кофеина
ФСР	0,8+ _{-0,05}	0,3+ _{-0,05}	1,8+ _{-0,05}	0,8+ _{-0,05}
ТЦ*				5
ФСР ТЦ	0,7+ _{-0,05}	0,25+ _{-0,05}	1,2+ _{-0,05}	0,35+ _{-0,05}

*мембраны фрагментов терминальных цистерн саркоплазматического ретикулула, освобожденные от свободных жирных кислот методом экстракции в присутствии сывороточного альбумина человека.

Кинетические кривые закисления экспериментальной среды при гидролизе АТФ. 1 - контроль; 2 - 5 мМ кофеина + 0,2 мМ тетракаина; 3 - 5 мМ кофеина + 3 мкМ рутениевого красного; 4 - 5 мМ кофеина; 5 - 10 мМ кофеина.

- **Влияние кофеина на пассивный выход ионов Са из ретикулума, нагруженного оксалатом Са²⁺.**
- Это выход Са²⁺ без участия Са²⁺-АТФазы и гидролиза АТФ.
- Моделирование изменений условий проницаемости мембраны СР проводили при полной экстракции свободных жирных кислот из мембран ФСР с помощью альбумина, освобожденного от всех лигандов.
- Имитацию увеличения проницаемости мембраны СР осуществляли при насыщении ФСР свободной жирной кислотой. Инкубировали с линолевой кислотой (15-25 мкг на 1 мг белка) 4 часа при 10⁰С.
- Измерения проводили в присутствии ЭГТА потенциометрическим методом.
- **Линолевая кислота** — одноосновная карбоновая кислота с двумя изолированными двойными связями
- $\text{CH}_3\text{—(CH}_2\text{)}_4\text{—CH=CH—CH}_2\text{—CH=CH—(CH}_2\text{)}_7\text{—COOH}$.
- В значительных количествах в натуральных маслах, кедровом, льняном, касторовом, подсолнечном, соевом, маковом, кукурузном, кофейном, овсяном, клюквенном, абрикосом, фисташковом, арахисовом, тыквенном и д.р.
- ***Биомедицинское значение линолевой кислоты***
- Участвует в синтезе арахидоновой кислоты (и, т.о., некоторых простагландинов), а в формировании фосфолипидов клеточных мембран.

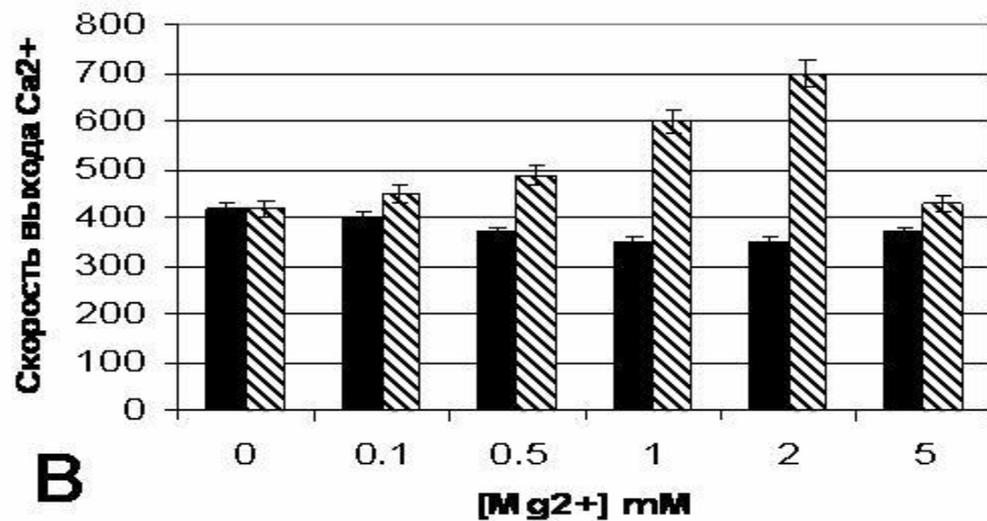
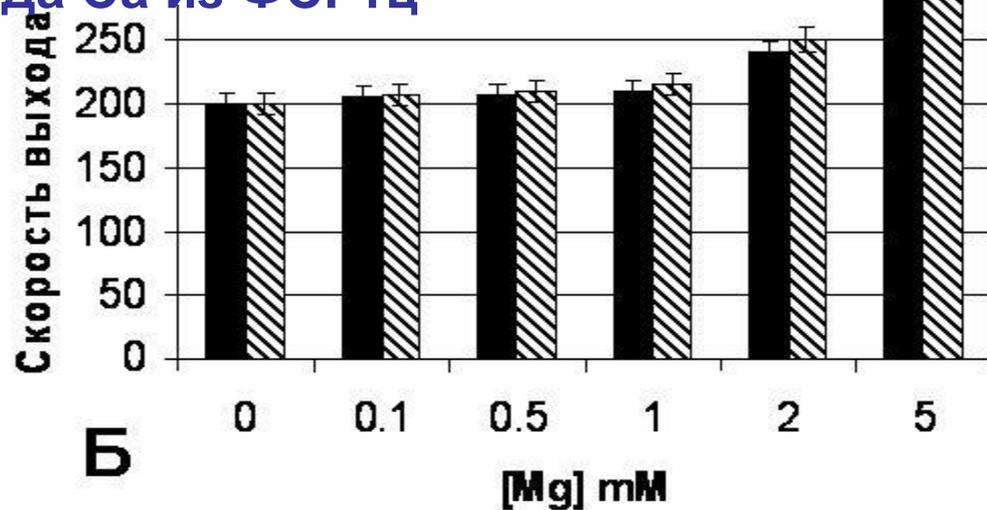
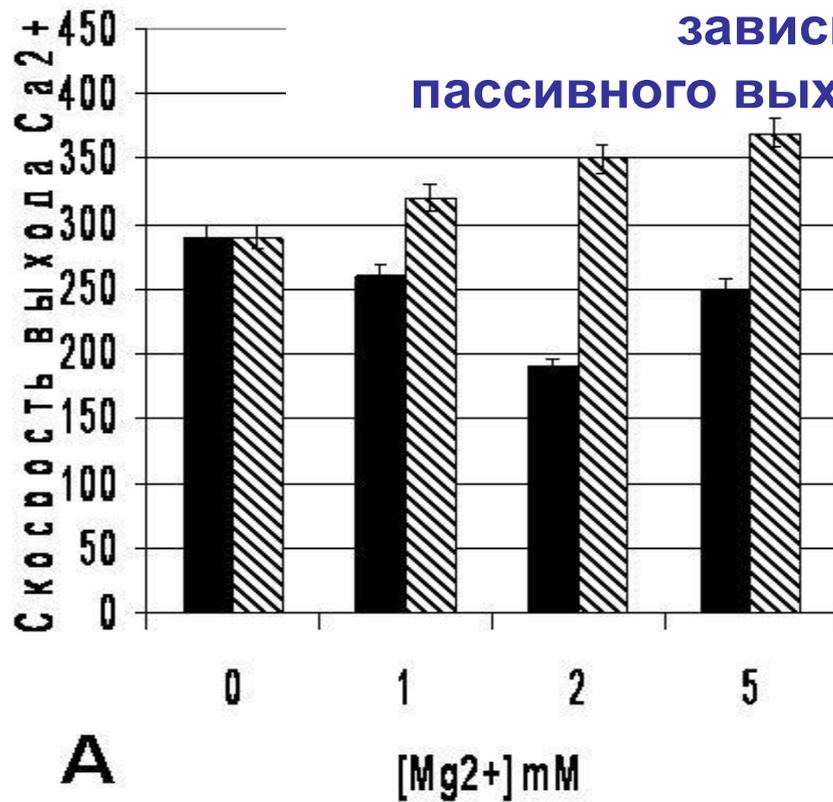
Активную нагрузку для измерения пассивного выхода Ca^{2+} из ФСР проводили в стандартных условиях с АТФ при добавлении CaCl_2 по мере поглощения. (ФСР 5мг белка + до 500 нмоль Ca на 1 мг белка).

Образец охлаждали до 4°C и осаждали ФСР. Затем отмывали в среде без АТФ и суспендировали в среде хранения.

Измерение выхода Ca из ФСР проводили методом рН-метрии в среде: 0,1М NaCl , 0,5 ЭГТА, 0,5 мМ имидазол рН 6,8, 37°C , при интенсивном перемешивании MgCl_2 варьировали от 0,1 мМ до 10 мМ

- В исходном ФСР, кофеин значительно усиливал пассивный выход Ca^{2+} . С увеличением концентрации Mg^{2+} пассивный выход Ca^{2+} **усиливался**.
- При экстракции СЖК из мембран пассивный выход Ca^{2+} с увеличением концентрации ионов Mg^{2+} **не зависел** от присутствия кофеина.
- **Насыщение мембран СЖК резко усиливало** пассивную проницаемость и ее зависимость от присутствия кофеина и ионов Mg^{2+} .
- При инкубации (3 часа при 10°C) ФСРтц с линолевой кислотой (20мкг на 1мг белка) пассивный выход Ca^{2+} под действием кофеина увеличивался и **существенно зависел от концентрации Mg^{2+} с максимумом (40%) при концентрации Mg^{2+} 2 мМ.**
- Малые концентрации ионов Mg^{2+} от 0 до 0,5 мМ практически не влияли на скорость выхода ионов Ca^{2+} в присутствии жирной кислоты в мембранах ФСР.
- При концентрации Mg^{2+} 2 мМ максимум пассивного выхода Ca^{2+} , и затем происходило снижение выхода Ca^{2+}
- При Mg^{2+} 5 мМ - исходное значение пассивного выхода Ca^{2+} .

Влияние кофеина и Mg^{2+} на зависимость пассивного выхода Ca^{2+} из ФСРтц



А – ФСРтц;

Б – ФСРтц после экстракции свободных жирных кислот;

В – ФСРтц после насыщения свободной жирной кислотой.

■ контроль, □ + 5 mM кофеина

- **В заключение** отметим, что пассивная проницаемость может оказывать небольшое влияние на градиент ионов Ca^{2+} между внутренним объемом ретикулума и окружающей цитоплазмой, т. е. на параметр, определяющий взаимодействие Ca^{2+} -насоса Ca^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} -освобождающего канала РнР.
- Но в присутствии эндогенных модуляторов, таких, как изменение концентрации ионов Mg^{2+} , или экзогенных модуляторов, таких как кофеин, пассивная проницаемость варьирует в большей мере и может давать вклад в изменение параметров функционирования ретикулума.
- Модуляторами могут также выступать и аналоги и антагонисты кофеина, что будет влиять на процессы мышечного сокращения.
- Стандартизация характеристик основных функциональных активностей препаратов СР: сопряженность Ca^{2+} -насоса АТФазы SERCA-2 и усиление активации выхода ионов Ca^{2+} через Ca^{2+} -канал рианодинового рецептора, а также выявление зависимости эффектов кофеина и ионов Mg^{2+} позволяет эффективнее использовать препараты СР для тестирования фармакологически активных веществ.