

# Lokális kalciumfelszabadulási események, a kalcium *sparkok* különféle izomtípusokban

Dr. Vincze János, PhD hallgató

DE OEC Élettani Intézet

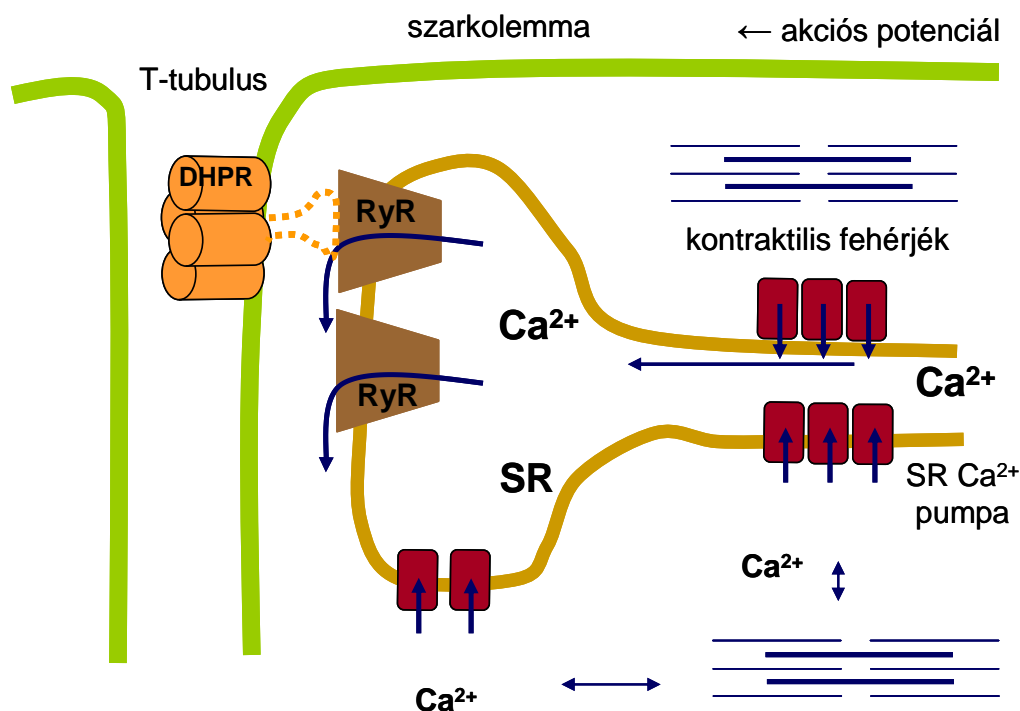
2013. december 20.

## Bevezetés

Az emlős szervezetek három fő izomtípusa, a vázizom, a szívizom és a simaizom esetén is az izomösszehúzódáshoz vezető intracelluláris szignalizációs folyamat kulcseleme a kalcium. Végző soron az izomsejtekben sarcoplasmának nevezett sejtplazma kalciumszintjének megnövekedése okozza a kontraktilis rendszer fehérjéinek konformációváltozását. Általánosságban ezen kalciumszint-emelkedésre mint globális folyamatra szokás gondolni, azonban az elmúlt két évtizedben bebizonyosodott, hogy fiziológias körülmények között mindhárom izomtípusban léteznek jóval kisebb, lokális kalciumfelszabadulási események, melyek nagyon fontos szerepet játszanak ezen sejtek kalciumhomeosztázisában. Ezen események leggyakoribb típusa az ún. kalcium *spark*, azaz ritkán használt magyar fordításban „szikra”, így a továbbiakban leggyakrabban ezen általános név alatt említem ezeket az eseményeket.

Intézetünk két munkacsoportjának tagjai is foglalkoznak a kalcium sparkok vizsgálatával különféle izomtípusokban, így a téma gyakran előkerül referálókon, kurzusokon, PhD és TDK előadásokon. Ezzel a rövid áttekintő munkával célom, hogy az Élettant ismerők egy elméleti bevezetőt kapjanak ezen előadások megértéséhez.

## Vázizom



1. ábra: Az elektromechanikai kapcsolat elemei vázizomban

Vázizomban az excitációs-kontrakciós kapcsolat (1. ábra) legfontosabb eleme a plazmamembránban, az ún. sarcolemmában található dihidropiridin-receptor (DHPR) és a sarcoplasmaticus reticulum (SR) membránjában található rianodinreceptor (RyR). Akciós potenciál hatására a DHPR konformációja megváltozik, így a vele közvetlen kapcsolatban lévő RyR-t megnyílásra készíti és rajta keresztül a koncentrációgradiensnek megfelelően kalciumionok áramlanak ki az SR-ből. Az összehúzódsért felelős kalciumkoncentráció-emelkedés forrása tehát a belső kalciumraktárként szolgáló SR, az extracelluláris térből a sejtbe kerülő  $Ca^{2+}$ -ionokra közvetlenül nincsen szükség az izomkontrakcióhoz.

Kételtűek vázizmán végzett kísérletek megmutatták, hogy a RyR-ok egyes calcium release unitjai (CRU) megnyílásukkal lokális kalciumfelszabadulást okozhatnak, mely jelenséget kalcium sparknak hívunk. A felszíni membrán depolarizációja hatására ezek az események egyre nagyobb frekvenciával figyelhetők meg, majd végül az összehúzódsát kiváltó globális kalciumszint-emelkedéssé állnak össze.

Emlősök felnőtt vázizmán azonban sem spontán sparkok nem figyelhetők meg, sem a felszíni membrán ingerlésének hatására nem láthatók olyan sparkok, melyekből a globális kalciumfelszabadulás összeállna. Megfigyelhetők azonban kalcium sparkok a fejlődő vázizomsejtekben, amikor a DHPR-RyR kapcsolat még nem állt össze, valamint kísérletes körülmények között a felszíni membrán permeabilizálásával is jelentősen megnövelhető a sparkok frekvenciája.

Emlősök vázizmán azonban fiziológias ingerlés hatására is megfigyelhetőek az ún. *emberök*, melyek a sparknál jóval alacsonyabb, ám folyamatosan, akár több száz 100 ms hosszú időtartamon keresztül fenntartott konstans amplitúdójú események. A kételtűek és az emlősök vázizmában megfigyelhető lokális kalciumfelszabadulási események közötti különbségek megmutatják, hogy míg előbbiek esetében a kalcium által indukált kalciumfelszabadulás (CICR) jelentős szerepet játszik az izomműködésben, az utóbbiak esetében szerepe mérsékelt (Niggli, 2007).

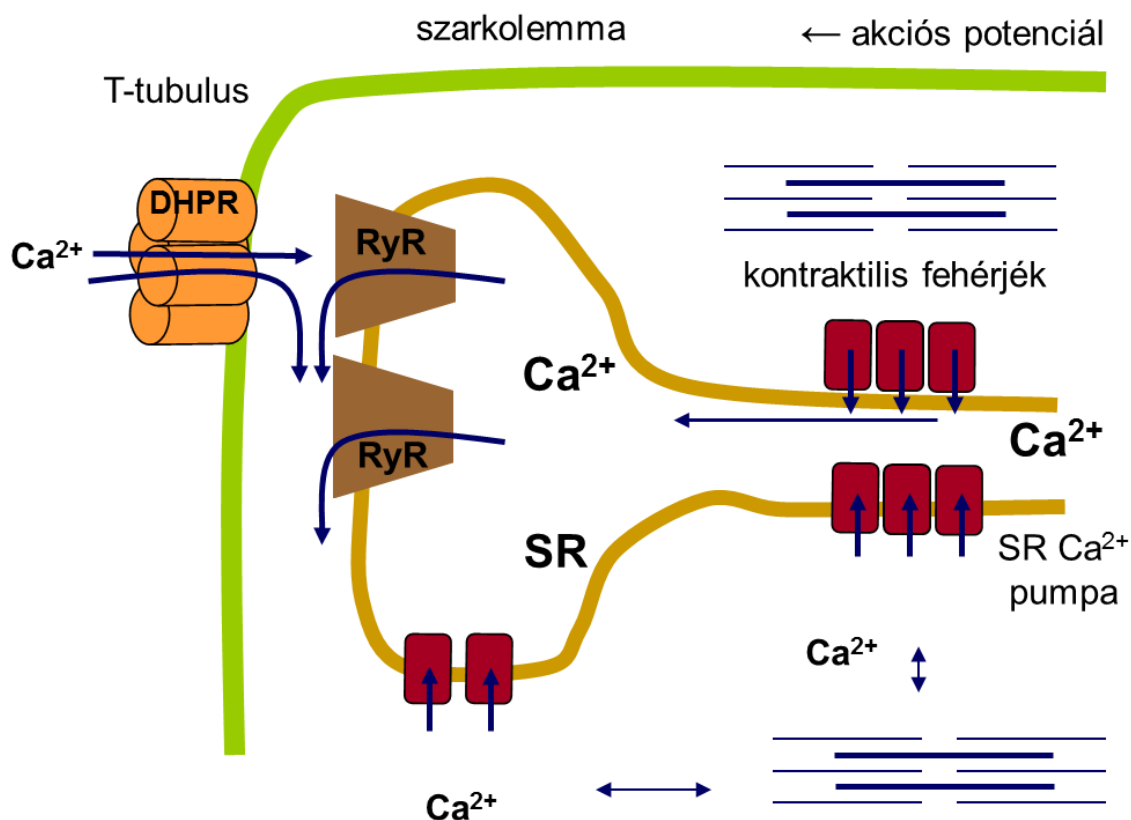
A vázizomban megfigyelhető lokális kalciumfelszabadulási események szerepének teljesen pontos megértése még várat magára, azonban számos pathológias állapotban, ill. bizonyos gyógyszerek hatására karakterisztikájuk jelentősen megváltozik, így tanulmányozásuk hozzájárulhat e folyamatok megismeréséhez (Füzi, 2012).

## Szívizom

A fentiekben ismertetett vázizomhoz képest a szívizom elektromechanikai kapcsolatában (2. ábra) jelentős különbség, hogy itt a DHPR (más néven L-típusú kalciumcsatorna) valóban kalciumcsatornaként funkcionál és a RyR megnyílását nem az azzal kialakított alloszterikus kapcsolaton keresztül okozza, hanem a csatorna megnyílása után az extracelluláris térből beáramló kalciumionok CICR révén okozzák az SR membránjában található RyR-ek megnyílását, az SR-ből további kalciumfelszabadulást okozva.

A szívizom működéséhez a külső térből történő kalciumbeáramlás és CICR elengedhetetlen. Ennek megfelelően kalcium sparkok is nagy frekvenciával és az egyes kontrakciók elemi eseményeként figyelhetők meg a szívizomsejtekben. Magát a kalcium sparkot is elsőként szívizomsejtek megfigyelése során írták le (Cheng, 1993).

A szívizomsejtekben látható kalcium sparkok megváltozását ma már számos, szívizmot érintő megbetegedés során megfigyelték és ezek pathomechanizmusában fontos szerepet tulajdonítanak az elemi kalciumfelszabadulási események megváltozásának.



2. ábra: Az elektromechanikai kapcsolat elemei szívműködésben

## Simaizom

A simaizomsejtek felépítése lényegesen eltér a fentiekben ismertetett két harántcsíkolt izomtípus felépítésétől. Ezekben a sejtekben az ún. kalcium sparkok nem is az intracelluláris kalciumraktár környékén, hanem subsarcolemmarisan figyelhetők meg és a felszíni membrán csatornáinak megnyílása eredményezi őket (Niggli, 2007). A másik két izomtípustól való jelentős eltérések miatt, valamint azon tény miatt, hogy a simaizom kalcium sparkjait intézetünk egyetlen munkacsoportja sem vizsgálja, részletes ismertetésüktől eltekintek.

## A kalcium sparkok vizsgálata

A kalcium sparkok megfigyelésére általában fluoreszcens kalciumindikátor festéket és konfokális mikroszkópot használunk line-scan vagy x-y képalkotási módozatokban. Bár az utóbbi képalkotási módszer lényegesen nagyobb területről ad átfogó képet, egészen a csak a közelmúltban elérhetővé vált nagysebességű konfokális mikroszkópok megjelenéséig időbeli felbontása elégtelen volt az egyes sparkok tanulmányozására, mivel még egy adott esemény szkennelésére felhasznált idő alatt is jelentős távolságra diffundált el az SR-ből kiáramlott kalcium.

A feldolgozandó adatok nagy volumene és a manuális elemzés nehéz reprodukálhatósága miatt már a kezdetektől automatikus kiértékelő programokat készítettek a sparkok vizsgálatával foglalkozó munkacsoportok. A legelső igazán széles körben elterjedt algoritmus (Cheng, 1999) a kettős küszöbölés módszerére épül, és bár kiválóan alkalmas jó jel-zaj arányú felvételek értékelésére, de csak igen korlátozottan használható olyan, a való életben gyakran előforduló helyzetekben, ahol a konfokális felvétel jel-zaj aránya elmarad a kívánatostól. A nagysebességű konfokális mikroszkópia elterjedése is új algoritmusok létrehozását tette szükségessé. Számos munkacsoport, köztünk intézetünk munkatársai is hozzájárultak ezen terület fejlődéséhez (Bányász, 2007; Szabó, 2010; Vincze, 2013).

Line-scan képek esetén az alábbi paraméterek kerülnek általában meghatározásra a sparkokról:

- amplitúdó (*Amp*)
- térbeli félérték-szélesség a sejt hossz tengelyével párhuzamosan (*FWHM-X*)
- a felszálló szár időtartama (*rise time*)
- a spark teljes hossza

X-Y képek esetén a következő paraméterek kerültek meghatározásra az egyes sparkokról:

- amplitúdó (*Amp*)
- térbeli félérték-szélesség a sejt hossz tengelyével párhuzamosan (*FWHM-X*)
- térbeli félérték-szélesség a sejt hossz tengelyére merőlegesen (*FWHM-Y*)
- a legközelebbi Z-vonal távolsága
- a spark amplitúdójának helye a képen (*X* ill. *Y*)

Az egyedi sparkok paraméterein kívül igen fontos még az egy felvételsorozaton megfigyelhető sparkfrekvencia is, mely paraméter megbízhatósága azonban kérdéses, csak teljesen uniformizált automatikus elemzése alkalmazása esetén értékelhető.

## Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## Irodalomjegyzék

1. Bányász T., Y. Chen-Izu, CW. Balke, LT. Izu (2007). A new approach to the detection and statistical classification of Ca<sup>2+</sup> sparks. *Biophys J.* **92(12)**, 4458-65.
2. Cheng H, WJ. Lederer, MB. Cannel (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* **262**, 740-744.
3. Cheng H, LS. Song, N. Shirokova, A. Gonzales, EG. Lakatta, E. Ríos, MD. Stern (1999). Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images. Theory and studies with an automatic detection method. *Biophys. J.* **76**, 606-617.
4. Füzi M, Z Palicz, J Vincze, J Cseri, Z Szombathy, I Kovács, A Oláh, P Szentesi, P Kertai, G Paragh, L Csernoch (2012). Fluvastatin-induced alterations of skeletal muscle function in hypercholesterolaemic rats. *J Muscle Res Cell Motil.* **32(6)**: 391-401.
5. Niggli E, N. Shirokova (2007). A guide to sparkology: The taxonomy of elementary cellular Ca<sup>2+</sup> signaling events, *Cell Calcium* **42 380**, 379-387.
6. Szabó LZ, J Vincze, L Csernoch, P Szentesi (2010). Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms. *J Theor Biol.* **264(4)**:1279-92.
7. Vincze J, LZ. Szabó, B. Dienes, P. Szentesi, L. Csernoch (2013). Efficient Automatic Analysis of High-Speed Confocal Images Containing Localized Calcium Release Events. *Biophys J.* **104(2 Suppl)**, 437.