

*Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi za poświęcony mi czas*

ANTONI WRZOSEK

*Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN  
Pasteura 3, 02-092 Warszawa*

## JONY WAPNIA W REGULACJI SKURCZU MIĘŚNIA SERCOWEGO

### WSTĘP

Mięsień sercowy jest zbudowany z komórek, które łączą się ze sobą za pomocą wstawek (ang. intercalated discs). W strukturach tych występują kanały łączące komórki, które czynią z serca powiązane ze sobą elektrycznie syncytia (KATZ 1992). W komórkach mięśnia sercowego widzianych w mikroskopie świetlnym obserwuje się prążkowania zbliżone do tych, jakie występują w mięśniach szkieletowych. Głębsze wnikięcie w strukturę mięśnia sercowego za pomocą mikroskopu elektronowego ujawnia budowę sarkomeryczną mięśnia, w której można wyróżnić grube i cienkie filamenty. Rekonstrukcja włókien mięśniowych aparatu skurczu pozbawionego białek regulatorowych pokazuje, że do skurczu są niezbędne jony magnezu i ATP jako źródło energii. Grube i cienkie filamenty, których głównymi składnikami są miozyna i aktyna, stanowią podstawę aparatu skurczu. Białka te oddziałując ze sobą, tworzą połączenia — mostki poprzeczne (ang. cross-bridges), dzięki którym filamenty są zdolne do przesuwania się względem siebie.

Do tego, ażeby proces skurczu mięśnia był zależny od jonów wapnia, niezbędna jest obecność białek regulatorowych, kompleksu troponin (TnI, TnT i TnC) i tropomiozyny. Wiązanie  $\text{Ca}^{2+}$  z TnC wywołuje kaskadę reakcji, które prowadzą do skurczu mięśnia (COOKE 1987).

Chociaż od odkrycia roli zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>o</sub> w skurczu mięśnia sercowego minęło ponad sto lat (RINGER 1883), nadal proces ten jest przedmiotem licznych studiów naukowych. Obecnie podstawowe mechanizmy związane z metabolizmem jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) w komórkach serca są stosunkowo dobrze poznane, jednak dokładny

sposób oddziaływania tych jonów z aparatem skurczu komórki mięśniowej, czynniki regulujące i powiązania pomiędzy różnymi systemami transportu  $\text{Ca}^{2+}$  nie są do końca wyjaśnione.

Do wywołania skurczu mięśnia sercowego, oprócz zewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$ , jest niezbędna depolaryzacja błony plazmatycznej manifestująca się jako potencjał czynnościowy. W wyniku tego procesu następuje otwarcie kanałów wapniowych typu L i T oraz napływ  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza komórki sercowej (BERS 1991). Jednak ta ilość jonów wapnia nie jest wystarczająca do wywołania skurczu, powoduje natomiast otwarcie kanału wapniowego znajdującego się w błonach sarkoplazmatycznego retikulum (SR) i uwolnienie  $\text{Ca}^{2+}$  (ang.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release) zgromadzonych tam w procesie aktywnego transportu. Proces skurczu może się powtórzyć, gdy jony wapnia znajdujące się w cytozolu komórki [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> zostaną usunięte. W procesie obniżenia poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu komórek serca jest zaangażowanych szereg białek transportujących ten jon.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza z błon SR transportuje jony wapnia do ich wnętrza kosztem rozkładu ATP. W ten sposób jest usuwana większość  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplazmy (w przypadku serca szczura 87%). Wymieniacz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  przemieszcza przez błonę  $\text{Ca}^{2+}$  z jednoczesnym transportem  $\text{Na}^+$  w drugą stronę oraz  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza z błony plazmatycznej usuwa jony wapnia na zewnątrz komórki. Istotną rolę odgrywają również mitochondria (NEGRETTI i współaut. 1993). Każdy z tych systemów podlega specyficznym procesom regulacji skutkiem czego może być zmieniająca się ilość  $\text{Ca}^{2+}$  napływająca do lub wypływająca z komórki serca (BERS 1991).

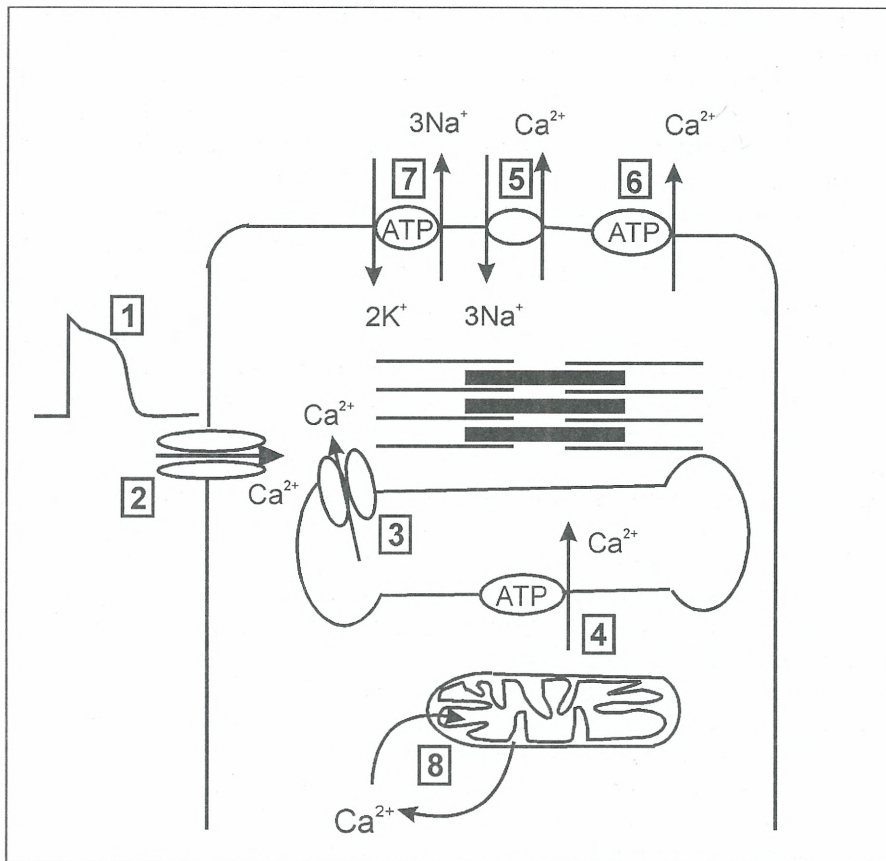
## SYSTEMY TRANSPORTUJĄCE JONY WAPNIA W KOMÓRCIE MIĘŚNIA SERCOWEGO

WYMIENIACZ  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 

Po raz pierwszy obecność wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  w sercu została wykazana przez REUTERA i SEITZA (1968). Mullins stwierdził, że reakcja wymiany jest elektrogenna i udowodnił, że wymiennicze  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  jest bezpośrednio zaangażowany w ruchy  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach mięśnia sercowego (MULLINS 1979). Obecnie powszechnie przyjmuje się, że funkcja wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  w komórce mięśnia sercowego polega na transporcie przez błonę 3 jonów sodu w wymianie z jednym jonem wapnia, transportowanym w przeciwnym kierunku. Stechiometria  $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$  sprawia, że transport jest elektrogenny, zaś jego kierunek zależy od potencjału błonowego (CRESPO i współaut. 1990). Wymiennicze  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  charakteryzuje się wysoką maksymalną szybkością transportu  $\text{Ca}^{2+}$  oraz niskim do nich powinowactwem, co sprawia, że jest on bardzo wydajny w usuwaniu  $\text{Ca}^{2+}$ , kiedy

stężenie tego kationu podwyższa się w czasie cyklu skurczowo-rozkurczowego. Ostatnio, wykorzystując techniki biologii molekularnej, sklonowano wymiennicze  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  z biblioteki cDNA serca psa (NICOLL i współaut. 1990). Wymiennicze  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  z serca człowieka jest białkiem o masie cząsteczkowej 120 kDa, złożonym z 973 aminokwasów, tworzącym prawdopodobnie 11 domen transbłonowych. Duży fragment ekspozycyjny do cytoplazmy znajduje się pomiędzy 5 a 6 transbłonową helisą (KOMURA i współaut. 1992). Usunięcie tego fragmentu nie powodowało zaniku właściwości funkcjonalnych białka, co świadczy, że ta część cząsteczki pełni rolę regulatorową.

Kontrowersje budzi nadal lokalizacja wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Za pomocą przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie zlokalizowano go w błonach systemu T (FRANK i współaut. 1992), ale także w błonach nie należących do systemu T oraz w fragmentach błon wstawek w mięśniu sercowym (KIEVAL i współaut. 1992).



Rys. 1. Schemat przedstawiający ruchy  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce mięśnia sercowego.

[1] Potencjał czynnościowy. [2] Kanał typu L, zależny od potencjału błonowego. [3] Kanał uwalniający  $\text{Ca}^{2+}$  z wnętrza sarkoplazmatycznego retikulum. [4] Pompa  $\text{Ca}^{2+}$  z błony sarkoplazmatycznego retikulum. [5] Wymiennicze  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . [6] Pompa wapniowa z błony plazmatycznej. [7]  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaza. [8] Mitochondrialna wymiana  $\text{Ca}^{2+}$ .

Wymieniacz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  spełnia niezwykle ważną rolę w utrzymaniu homeostazy jonów wapnia w komórce. Ilość  $\text{Ca}^{2+}$  napływająca do komórki poprzez kanały wapniowe podczas działania potencjału czynnościowego jest usuwana przez wymieniacz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Wprawdzie dane doświadczalne wykazują, że ilość  $\text{Ca}^{2+}$  jaka napływa do komórki przez wymieniacz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  w czasie depolaryzacji błony komórkowej jest niewystarczająca do znaczącej zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, ale pozwala jednak zapoczątkować wpływ  $\text{Ca}^{2+}$  z systemu SR. Jak się przypuszcza, jest związane to z tworzeniem się podbłonowego gradientu stężeń jonów sodu podczas depolaryzacji błony komórkowej (CARMELIET 1992). Pośrednio za taką interpretacją przemawia fakt, że po zahamowaniu aktywności kanałów  $\text{Ca}^{2+}$  błony plazmatycznej w obecności verapamilu i aktywacji kanału  $\text{Ca}^{2+}$  z błon SR w obecności rianodyny, wzrasta stężenie jonów wapnia w cytoplazmie (BEUCKELMANN i WIER 1989). Wraz ze wzrostem stężenia jonów wapnia wzrasta aktywność wymieniacza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , gdyż proces ten zależy od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów sodu, potencjału błonowego i ulega hamowaniu przez  $\text{Ni}^{2+}$ , które są uważane za inhibitor wymieniacza. Dodatkowo stwierdzono, że wprawdzie nifedypina, związek specyficznie blokujący prąd wapniowy, ma niewielki wpływ na skurcz miocytów świnki morskiej, jednak w obecności specyficznego peptydowego inhibitora wymieniacza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (XIP), nifedypina blokuje skurcz komórki sercowej. Nie wszyscy badacze zgadzają się z funkcją wymieniacza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , jako systemu wywołującego skurcz mięśnia sercowego, argumentując swoje wątpliwości zależnością jego aktywności od stężenia wewnątrzkomórkowego jonów sodu oraz zróżnicowaną zależnością od potencjału błonowego (BOUCHARD i współaut. 1993). Oprócz zmiennego kierunku transportu jonów wapnia w zależności od potencjału błonowego wymieniacz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  podlega regulacji przez szereg czynników, takich jak zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{H}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  oraz ATP (SCHULZE i współaut. 1993).

#### KANAŁY WAPNIOWE W BŁONIE PLAZMATYCZNEJ

Spośród znanych czterech typów kanałów wapniowych, P, T, N i L, występujących w błonach plazmatycznych komórek pobudliwych, w błonie plazmatycznej mięśnia sercowego zidentyfikowano dotychczas jedynie dwa kanały typu L i T. Kanały wapniowe są określane jako specyficzne filtry, które po związaniu tego kationu do rejonu przybłonowego transportują go do

wnętrza komórki, dzięki szybkiemu otwieraniu i zamykaniu kanału (HILLE 1992). Dokładny mechanizm działania kanału wapniowego w sercu podczas depolaryzacji błony plazmatycznej nie jest dokładnie wyjaśniony. Wyróżnia się trzy stany funkcjonalne kanału: stan 0, kiedy kanał nie ulega otwarciu pod wpływem depolaryzacji błony; stan 1, kiedy jony wapnia są przepuszczane w trakcie szybkiego otwierania mechanizmu bramkowego kanału i stan 2, kiedy wzmożony napływ jonów wapnia towarzyszy depolaryzacji błony, dzięki wydłużonemu czasowi otwarcia kanału i skróceniu czasu jego zamknięcia. Większość badań dotyczących identyfikacji wapniowego kanału typu L przeprowadzono na mięśniach szkieletowych, gdzie jest go najwięcej (FOSSET i współaut. 1983).

Chociaż kanały wapniowe typu L z mięśnia sercowego różnią się funkcjonalnie od kanałów typu L z mięśni szkieletowych, pełniących rolę czujników napięcia związanych z kanałami dla wypływu  $\text{Ca}^{2+}$  z błon SR, przypuszcza się, że budowa tych dwóch typów kanałów jest bardzo podobna (CATTRALL 1991). Kanał wapniowy typu L jest oligomerem składającym się z pięciu podjednostek: alfa 1, alfa 2, beta, gama i delta. Podjednostki alfa 2 i delta są połączone mostkiem dwusiarczkowym i są kodowane przez ten sam gen, a określa się je jako podjednostka alfa 2/delta. Jednostką centralną kanału wapniowego typu L jest podjednostka alfa 1, która tworzy właściwy kanał, a także zawiera miejsca wiązania agonistów i antagonistów oraz miejsce fosforylacji przez kinazę zależną od cyklicznego AMP. Zachowuje ona również właściwości czujnika potencjału błonowego. Jednostka alfa 1 z mięśnia sercowego jest nieco większa niż odpowiadająca jej jednostka z mięśnia szkieletowego. Pozostałe podjednostki kanału wapniowego typu L spełniają rolę regulatorową (SINGER i współaut. 1991).

Są znane trzy różne klasy związków organicznych, które są antagonistami kanału wapniowego: dihydropirydyny (nifedypina), fenyloalkiloaminy (verapamil) i benzotiazepiny (diltiazem). Związki te mogą oddziaływać z trzema różnymi miejscami w kompleksie białek kanału połączonymi ze sobą allosterycznie. Znany jest również aktywator kanału wapniowego, o strukturze podobnej do dihydropirydyny, Bay K86-44. Wiąże się on do kanału wapniowego typu L w tym samym miejscu, co dihydropirydyna, powodując przedłużoną aktywację kanału (TRIGGLE 1992).

Mechanizm otwierania kanału wapniowego pod wpływem stymulacji elektrycznej, jak również jego zamknięcie po ustaniu impulsu, nie jest jeszcze w pełni jasny. Wykazano, że w

procesie otwarcia kanału wapniowego typu L jest zaangażowana  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ektoATPaza, która występuje w błonie plazmatycznej komórek serca, a jej aktywacja wzrasta liniowo wraz ze wzrostem siły skurczu mięśnia sercowego (VORNANEM 1984).

Innym kanałem wapniowym, zaangażowanym w transporcie jonów wapnia w mięśniu sercowym, jest kanał typu T (typ szybki). Do aktywacji wymaga on początkowej hyperpolaryzacji, zaś jego inaktywacja jest zależna od potencjału błonowego. Kanał ten jest hamowany w mniejszym stopniu przez dihydropirydyny niż kanał typu L. Jak przypuszcza się, odgrywa on znaczną rolę w komórkach węzła zatokowo-przedsińcowego i w komórkach Purkiniego, a niedawno został włączony w regulację wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia (HIRANO i współaut. 1989).

#### POMPA WAPNIOWA BŁONY PLAZMATYCZNEJ

Ważnym enzymem występującym w błonie plazmatycznej komórki sercowej i transportującym jony wapnia z cytoplazmy na zewnątrz komórki jest pompa wapniowa,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza

#### KANAŁY UWALNIAJĄCE JONY WAPNIA Z BŁON SARKOPLAZMATYCZNEGO RETIKULUM

Sarkoplazmatyczne retikulum jest uważane za główny system błon w komórce, odpowiedzialny za metabolizm jonów wapnia w czasie cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśnia sercowego. W błonach SR występują dwa podstawowe systemy transportu jonów wapnia:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza, wykorzystująca energię rozkładu ATP do procesu pompowania  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza pęcherzyków wbrew gradientowi stężeń tego kationu oraz dwa typy kanałów wapniowych uwalniających  $\text{Ca}^{2+}$  z cystern SR do cytoplazmy. Aktywność pierwszego rodzaju kanałów jest hamowana przez roślinny alkaloid rianodynę, drugi typ kanałów ulega otwarciu po związaniu 1,4,5-trisfosforanu inozytoli ( $\text{IP}_3$ ). Określa się je odpowiednio jako receptory rianodynowy i  $\text{IP}_3$ . Procesy aktywacji tych kanałów zachodzą w odmienny sposób. Receptory  $\text{IP}_3$  są aktywowane dzięki związaniu odpowiedniego agonisty do jego receptora znajdującego się w błonie plazmatycznej komórki, co powoduje aktywację fosfolipazy C poprzez białko G. Fosfolipaza C trawi dwufosforan fosfatydyloinozytoli do  $\text{IP}_3$  i dwuglicerydu.  $\text{IP}_3$  wiąże się do swojego receptora będącego jednocześnie kanałem wapniowym i wywołuje wypływ  $\text{Ca}^{2+}$ . Kanały zależne od rianodyny są aktywowane przez niewielkie ilości  $\text{Ca}^{2+}$  wpływające do wnętrza komórki po-

przypominająca enzym z błon wewnątrzkomórkowych. Jej masa cząsteczkowa wynosi 140 kDa. Wykorzystując energię pochodzącą z rozkładu ATP, ten system transportowy jest w stanie aktywnie usuwać jony wapnia wbrew gradientowi stężeń tego kationu istniejącym pomiędzy cytoplazmą a przestrzenią zewnątrzkomórkową.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza z błony plazmatycznej różni się od wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  tym, że posiada względnie wysokie powinowactwo do jonów wapnia ( $K_m = 0,5 \mu\text{M}$ ) ale niską zdolność transportową. Aktywność pompy wapniowej podlega regulacji przez procesy fosforylacji (przy udziale kinazy zależnej od cyklicznego AMP) i defosforylacji oraz zależnego od  $\text{Ca}^{2+}$  oddziaływania z kalmoduliną. Kwaśne fosfolipidy, na przykład fosfatydyloseryna, również odznaczają się zdolnością do aktywacji ATPazy, zwiększając jej wydajność. Mechanizm regulacji fosforylacji może być ważny w utrzymaniu równowagi wapniowej w komórce, po beta-adrenergicznej stymulacji mięśnia sercowego. Badania elektrofizjologiczne i biochemiczne wykazały, że pompa wapniowa błony plazmatycznej komórek serca usuwa tylko 1% cytozolowego wapnia w trakcie cyklu skurczowo-rozkurczowego (CARAFOLI 1991).

przez kanały typu L w trakcie depolaryzacji błony komórkowej.

Receptory  $\text{IP}_3$  i rianodynowy wykazują niezwykle podobieństwo struktury. Oba są tetramerami zbudowanymi z podjednostek (310 kDa dla receptora  $\text{IP}_3$  i 560 kDa dla receptora rianodynowego). C-końcowy rejon obu białek wykazuje duży stopień homologii, natomiast części cytozolowe różnią się znacznie od siebie (POZZAN i współaut. 1994). Uważa się, że kluczową rolę w uwalnianiu  $\text{Ca}^{2+}$  z błon SR w procesie sprzężenia pobudzenie-skurcz (ang. E-C coupling) w sercu, odgrywa kanał rianodynowy. Kanały zależne od rianodyny zlokalizowano w rejonach cystern SR kontaktujących się z błoną plazmatyczną, a ich cytozolowe domeny są skierowane w stronę błony kanałów systemu T, gdzie występują kanały typu L. Takie rozmieszczenie kanałów ułatwia wypływ jonów wapnia pod wpływem niewielkich ilości  $\text{Ca}^{2+}$  napływających poprzez kanały typu L.

Określono strukturę podjednostki kanału rianodynowego pochodzącego z serca królika. Jest zbudowana z 4969 reszt aminokwasowych a jej masa cząsteczkowa wynosi 560 kDa. Kanał ulega otwarciu po związaniu kofeiny. Niskie stężenia rianodyny powodują otwarcie kanału, natomiast wysokie — jego zamknięcie (OTSU i

współaut. 1990). Obecność receptora  $IP_3$  w błonach SR budzi nadal kontrowersje. Jedni autorzy byli w stanie wykazać indukowanie wypływu  $Ca^{2+}$  przez  $IP_3$  w uprzepuszczeniach preparatach serca lub całkowicie pozbawionych błony (KENTISH i współaut. 1990), innym jednak

nie udało się wykazać obecności kanału, być może ze względu na specyficzną jego lokalizację. Jak wykazano, zwiększoną ekspresją tego receptora charakteryzują się komórki Purkiniego (GARZA i współaut. 1993).

#### POMPA WAPNIOWA BŁON SARKOPLAZMATYCZNEGO RETIKULUM

Pobieranie wapnia do wnętrza pęcherzyka SR odbywa się poprzez stymulowaną  $Ca^{2+}$  i zależną od  $Mg^{2+}$  ATPazę. Jest to białko błonowe zlokalizowane głównie w błonach systemu podłużnych kanalików SR o masie cząsteczkowej 110 kDa. Stanowi ono około 50% wszystkich białek błon SR serca. Spośród znanych izoform ATPazy tylko tak zwana izoforma SERCA2a występuje w mięśniu sercowym (GROVER i KHAN 1992).  $Ca^{2+}$ -ATPaza z błon SR odznacza się wysokim powinowactwem do jonów wapnia ( $K_m = 0,5 \mu M$ ) oraz wyższą od  $Ca^{2+}$ -ATPazy z błony plazmatycznej szybkością maksymalną ( $V_{max}$ ), co sprawia, że ten enzym odgrywa decydującą rolę w usuwaniu  $Ca^{2+}$  z cytozolu komórki mięśniowej (INESI 1985).  $Ca^{2+}$ -ATPaza w jednym cyklu transportuje dwa jony wapnia z cytozolu do wnętrza pęcherzyków SR, zużywając jedną cząsteczkę ATP. Enzym ten podlega regulacji przez niskocząsteczkowe białko zwane fosfolambanem (6 kDa) występujące w formie pentameru, które w postaci zdefosforylowanej łączy się z  $Ca^{2+}$ -ATPazą i powoduje jej inhibicję (obniżając  $V_{max}$  enzymu i podwyższając powinowactwo białka do  $Ca^{2+}$ ). Fosforylacja fosfolambanu z udziałem kinazy zależnej od cyklicznego AMP i kinazy zależnej od Ca/kalmoduliny powoduje oddysocjowanie tego białka od  $Ca^{2+}$ -ATPazy i znoszenie tym samym jego hamującego wpływu na enzym (COLYER 1993). Dzięki odkryciu nowych związków hamujących aktywność ATPazy można obecnie specyficznie zahamować

aktywność enzymu, co ułatwia określenie jego roli w procesie skurczowo-rozkurczowym serca (CHIESI i współaut. 1994, JANIĄK i współaut. 1996).

#### MITOCHONDRIALNY TRANSPORT JONÓW WAPNIA

Mitochondria mają zdolność akumulacji dużej ilości jonów wapnia w macierzy. Mitochondrialny uniport posiada niższe powinowactwo dla  $Ca^{2+}$  niż  $Ca^{2+}$ -ATPaza błon SR i prawdopodobnie zyskuje na znaczeniu tylko wówczas, gdy stężenie  $Ca^{2+}$  wzrośnie powyżej  $0,5 \mu M$  (POZZAN i współaut. 1994). Dlatego też w fizjologicznym przedziale stężeń  $Ca^{2+}$  w komórkach mitochondria nie mogą pobierać znacznych jego ilości, a zatem odgrywają jedynie uboczną rolę podczas cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśnia sercowego. Mitochondrialny transport jonów wapnia jest jednak niezbędny w regulacji procesów wytwarzania ATP, ponieważ większość enzymów zaangażowanych w procesie powstawania energii jest zależna od  $Ca^{2+}$  (MCCORMACK i współaut. 1990). Zdolność mitochondriów do akumulacji  $Ca^{2+}$  jest niezwykle istotna w stanach patologicznych mięśnia sercowego, a ostatnio wykazano, że zmiany stężeń  $Ca^{2+}$  w mitochondriach naśladują analogiczne zmiany stężenia wapnia w cytozolu w cyklu skurczowo-rozkurczowym (CHACON i współaut. 1996).

#### ZMIANY SIŁY SKURCZU MIĘŚNIA SERCOWEGO WYWOŁANE ZMIANAMI CYTOPLAZMATYCZNEGO STĘŻENIA JONÓW WAPNIA

Wewnątrzkomórkowe, spoczynkowe stężenie jonów wapnia w mięśniu sercowym utrzymuje się na poziomie  $1-2 \times 10^{-7} M$ . Górną granicą, powyżej której układ przestaje być czuły na  $Ca^{2+}$ , jest stężenie  $1 \times 10^{-5} M$ .  $Ca^{2+}$  może spełniać swoją rolę regulatorową tylko wtedy, gdy nie zachodzi zjawisko, że bardzo niewielka zmiana stężenia jonów wapnia powoduje znaczne zmiany siły skurczu (MOSS i współaut. 1986). Zależność ta jest rzeczywiście inna w mięśniu sercowym niż szkieletowym ze względu na fakt, że TnC z mięśni szkieletowych charakteryzuje

się inną stałą wiązania  $Ca^{2+}$ . Różnice te zostały uwidocznione w doświadczeniu, w którym TnC z mięśni szkieletowych zastąpiono białkiem z mięśnia sercowego. Nastąpiło wówczas znaczne rozszerzenie przedziału stężeń  $Ca^{2+}$ , w którym siła skurczu mięśnia ulegała zmianom (MOSS i współaut. 1986).

Podczas skurczu mięśnia sercowego stężenie  $Ca^{2+}$  nie osiąga nigdy wartości, w których następuje wysycenie włókien mięśniowych tym kationem. Powyżej pewnego poziomu aktywacji stężenie jonów wapnia w cytozolu może osiągnąć

nać takie wartości, które wywołują stan „przeładowania” komórki. Powoduje to spontaniczne wypływy  $\text{Ca}^{2+}$  z błon SR, co może prowadzić w efekcie do arytmii mięśnia sercowego (CLUSIN 1988). Opisana sytuacja może mieć miejsce w wyniku zastosowania związków, które zwiększają siłę skurczu mięśnia poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ . Zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$  może być wywołane podwyższeniem zewnątrzkomórkowego stężenia tych jonów, co powoduje ich zwiększony napływ do komórki i wzrost siły skurczu. Wzrost częstości skurczu lub zastosowanie podwójnej stymulacji jest również czynnikiem wywołującym znaczny efekt inotropowy (BERS 1991). Oprócz wymienionych czynników istnieją również związki chemiczne działające na systemy usuwające  $\text{Ca}^{2+}$  z cytozolu lub zwiększony napływ jonów do komórki, co w efekcie prowadzi do wzrostu stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ . Jednymi z najwcześniej stosowanych są glikozydy działające na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazę. Mechanizm ich działania nie jest bezpośrednio związany z transportem  $\text{Ca}^{2+}$ , wywołuje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Na}^+$ , co prowadzi z kolei poprzez wymienniczą  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  do zwiększonego napływu jonów wapnia do wnętrza komórki (MORGAN i BLINKS 1982).

Inną klasą związków są związki agonistyczne beta-receptorów, które wpływają na poziom cyklicznego AMP w komórce. Zwiększony poziom nukleotydu wywołuje aktywację kinazy białkowej A, zależnej od cyklicznego AMP. Enzym fosforyluje kanał wapniowy w błonie plazmatycznej, powoduje zwiększony napływ  $\text{Ca}^{2+}$  w czasie każdego potencjału czynnościowego. Kinaza A fosforyluje również fosfolamban w błonach SR, co prowadzi do zwiększenia aktyw-

ności pompy wapniowej, a zatem transportu  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza pęcherzyków SR. Efektem tego procesu jest zwiększenie ilości  $\text{Ca}^{2+}$  dostępnego podczas kolejnego skurczu mięśnia (KURIHARA i KONISHI 1987). Kinaza A fosforyluje również TnI, jednego z komponentów kompleksu regulatorowego aparatu skurczu. Fosforylacja TnI jest związana ze zmniejszeniem powinowactwa TnC do jonów wapnia. Jednym ze skutków obniżonej czułości TnC na  $\text{Ca}^{2+}$ , pomimo zwiększonego ich napływu do komórki, jest skrócenie czasu relaksacji mięśnia sercowego (MCIVOR i współaut. 1988).

Znana jest również klasa związków, zwiększająca stężenie cyklicznego AMP w komórce, poprzez bezpośrednie oddziaływanie tych związków z cyklazą adenylową (np. froskolina). Zwiększenie poziomu cyklicznego AMP następuje także w wyniku zahamowania fosfodiesterazy, enzymu rozkładającego ten nukleotyd przez związki, do których należą amrinon i milrinon. Zablockowanie procesów defosforylacji przez inhibitor fosfataz białkowych — kwas okadaikowy (z czarnej gąbki japońskiej) prowadzi do podwyższenia stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce, a co za tym idzie siły skurczu mięśnia sercowego (LEE i współaut. 1991).

Jak wspomniano wcześniej, omawiając kanał wapniowy z błon SR, rianodyna obniża poziom jonów wapnia dostępnych podczas skurczu usuwając je z cystern SR. Również wspomniane wcześniej inhibitory i aktywatory plazmatycznych kanałów wapniowych powodują znaczne zmiany w dostępności wapnia w komórce (BERS 1991). Również ATP ma wpływ na podwyższenie siły skurczu mięśnia (DANZIGER i współaut. 1988).

#### INNE MECHANIZMY REGULACJI SIŁY SKURCZU MIĘŚNIA SERCOWEGO

Zmiany poziomu jonów wapnia w komórce nie są jedynym czynnikiem, który może regulować siłę skurczu mięśnia sercowego. Jak już wspomniano, zależna od cyklicznego AMP fosforylacja białek komórki mięśniowej oprócz zwiększenia poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce wywołuje również zmianę czułości mięśni na jony wapnia poprzez fosforylację TnI. Można zatem wyobrazić sobie sytuację, że bez zmiany stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  a tylko zmieniając powinowactwo TnC do tego kationu można spowodować wzrost siły skurczu mięśnia. Siła skurczu mięśnia zależy przede wszystkim od ilości połączeń powstających pomiędzy aktyną i miozyną. Wzrost tych połączeń winien prowadzić do wzrostu siły skurczu, bez zmiany powinowactwa w stosunku do  $\text{Ca}^{2+}$ .

W praktyce trudno jest odróżnić zmiany czułości układu na  $\text{Ca}^{2+}$  od tych, które są związane ze zmianą maksymalnej siły skurczu. Możliwe jest to tylko wtedy, jeśli określimy zmiany siły skurczu mięśnia sercowego dla całego zakresu stężeń jonów wapnia (BLINKS i ENDOH 1986). Istnieją substancje (np. pimobendan), które powodują jednoczesny wzrost maksymalnej siły skurczu, jak również wzrost czułości układu na  $\text{Ca}^{2+}$ . Inne związki (kofeina) mogą powodować wzrost czułości na  $\text{Ca}^{2+}$ , z jednoczesnym obniżeniem maksymalnej siły skurczu. Przykłady te sugerują, że możliwe jest istnienie niezależnego mechanizmu regulującego zmiany czułości na  $\text{Ca}^{2+}$  i zmiany maksymalnej siły skurczu.

Od wielu lat znana jest zależność zmiany siły skurczu mięśnia sercowego od zmian naprężenia mięśnia sercowego. Zależność tą określa zasada Franka-Starligna. Jak się okazało, naprężenie mięśnia sercowego powoduje wzrost czułości układu na  $\text{Ca}^{2+}$ , jak również wzrost maksymalnej siły skurczu (wzrost połączeń aktyna-miozyna) (ALLEN i KENTISH 1988). Wzrost wewnątrzkomórkowego pH w mięśniu sercowym prowadzi również do zmian w czułości mięśni na jony wapnia i zmianę maksymalnej siły skurczu. Zwiększenie stężenia jonów fosforanowych, wywołuje zaś obniżenie czułości na  $\text{Ca}^{2+}$  i obniżenie maksymalnej siły skurczu. Obserwacje te są związane ze zjawiskami zachodzącymi w ischemii i niedotlenieniu mięśnia sercowego (KIHARA i współaut. 1989).

Szereg związków chemicznych powoduje zmiany czułości aparatu skurczu komórek serca w stosunku do jonów wapnia (kofeina, sulfamazol, isomazol, pimobendan i adibendan). Związki te dodatkowo hamują aktywność fosfo-

diesterazy. Mechanizm ich działania jest więc zbyt złożony, by mogły być wykorzystane w leczeniu chorób serca. Jednak ostatnio udało się zsyntetyzować związek EMD 53998, który jest jednym z optycznych izomerów mieszaniny racemicznej, posiadającym tylko właściwości uczulania układu kurczliwego na jony wapnia (BEIER i współaut. 1991). Praktyczne wykorzystanie tej substancji jest ograniczone faktem, że powoduje ona wzrost czułości na  $\text{Ca}^{2+}$  i przedłużenie czasu relaksacji mięśnia. Prowadzi to do sytuacji, jaka ma miejsce w niektórych stanach patologicznych. Ze względów praktycznych istnieje zatem konieczność syntezy takiego związku, który będzie zwiększał czułość mięśnia sercowego na jony wapnia z jednoczesnym zmniejszeniem przedziału aktywujących stężeń  $\text{Ca}^{2+}$ . Zastosowanie takiego hipotetycznego związku pozwoliłoby na zachowanie stałego czasu relaksacji mięśnia sercowego, zwiększając jedynie siłę jego skurczu.

## CALCIUM IONS IN REGULATION OF THE HEART MUSCLE CONTRACTION

### Summary

Mechanisms involved in the calcium ion transport and regulations in the cardiac cells are presented. However, not only calcium ions, but also the complex interaction between the myofibrils which transduce the  $\text{Ca}^{2+}$  signal into a force may be affected in several different ways by a large number

of interventions. Now it is widely accepted that the central role in the cardiac contractility is played by the relation between calcium ions and force. This article provides an overview of the cardiac inotropy.

### LITERATURA

- ALLEN D. G., KENTISH J. C., 1988. *Calcium concentration in the myoplasm of skinned ferret ventricular muscle following changes in muscle length*. J. Physiol. 407, 489-503.
- BEIER N., TOCHUS J., KLOCKOW M., LEUS I., WOLF H. P., 1991. *The two mechanisms of action of the racemic cardiotoxic EMD 53998, Ca sensitization and PDE inhibition, reside in different enantiomers*. J. Mol. Cell Cardiol. 23 (suppl. V), s 69.
- BERS D. M., 1991. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. Dordrecht, Kluwer.
- BLINKS J. R., ENDOH M., 1986. *Modification of myofibrillar responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  as an inotropic mechanism*. Circulation 73 (Suppl. III), 85-98.
- BOUCHARD R. A., CLARK R. B., GILES W. R., 1993. *Regulation of unload cell shortening by sarcolemmal sodium-calcium exchange in isolated rat ventricular myocytes*. J. Physiol. (London) 469, 583-599.
- BEUCKELMANN D. J., WIER W. G., 1989. *Sodium-calcium exchange in guinea pig cardiac cells: Exchange current and changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$* . J. Physiol. (London) 414, 499-520.
- CAPOGROSSI M. C., STERN M. D., SPUREGON H. A., LAKATTA E. G., 1988. *Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum limits  $\text{Ca}^{2+}$  dependent twitch potentiation in individual cardiac myocytes*. J. Gen. Physiol. 91, 133-155.
- CARAFOLI E., 1991. *Calcium pump of the plasma membrane*. Physiol. Rev. 71, 129-153.
- CARMELIE T., 1992. *A fuzzy subsarcolemmal space for intracellular  $\text{Na}^{2+}$  in cardiac cells?* Cardiovasc. Res. 26, 433-442.
- CATTRALL W. A., 1991. *Functional subunit structure of voltage-gated calcium channels*. Science 253, 1499-1500.
- CHACON E., OHETA H., HARPER I. S., TROLLINGER D. R., HERMAN B., LEMASTERS J.J., 1996. *Mitochondrial free calcium transients during excitation-contraction coupling in rabbit cardiac myocytes*. FEBS Lett. 382, 31-36.
- CHIESI M., WRZOSEK A., GRUENINGER S., 1994. *The role of the sarcoplasmic reticulum in various types of cardiomyocytes*. Mol. Cell. Biochem. 130, 159-171.
- CLUSIN W. T., 1988. *Role of calcium-activated ion currents in the heart*. [W:] *Physiology and pathophysiology of the heart*, 2nd edn. SPERELAKIS N. (red.) Kluwer, Boston.
- COLYER J., 1993. *Control of calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. A specific role for pentameric structure of phospholamban?* Cardiovasc. Res. 27, 1766-1771.
- COOKE R., 1987. *The mechanism of muscle contraction*. Crit. Rev. Biochem. 21, 53-118.
- CRESPO L. M., GRANTHAM C. J., CANNEL M. B., 1990. *Kinetics, stoichiometry and role of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange mechanism in isolated cardiac myocytes*. Nature 345, 618-621.
- DANZIGER R.S., RAFFAELI S., MORENO-SANCHEZ R., SAKAI M., CAPOGROSSI M.C., SPURGEON H. A., HANSFORD R. G., LAKATTA E. G., 1988. *Extracellular ATP has a potent effect to enhance cytosolic calcium and contractility in single ventricular myocytes*. Cell Calcium 9, 193-199.

- FOSSET M., JAIMOVICH E., DELPONT E., LAZDUNSKI M., 1983. [ $^3\text{H}$ ]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 258, 6086–6092.
- FRANK J. S., MOTTINO G., Reid., MOLDAI R. S., PHILIPSON K. D., 1992. Distribution of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange protein in mammalian cardiac myocytes: An immunofluorescence and immunocoloidal gold-labeling study. *J. Cell Biol.* 117, 337–345.
- GARZA L., SCHAFFINO S., VOLPE P., 1993. 1,4,5- triphosphate receptor in heart: Evidence for its concentration in Purkinje myocytes of conduction system. *J. Cell Biol.* 121, 345–353.
- GROVER A. K., KHAN I., 1992. Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. *Cell Calcium* 13, 9–17.
- HILLE B. (red.) 1992. *Ionic channels of excitable membrane*. 2nd edn. Sunderland, Sinauer Associates, Inc.
- HIRANO Y., FOZZARD H. a., JANUARY C. T., 1989. Characterization of L- and T-type channels in canine cardiac Purkinje cells. *AM. J. Physiol.* 256, H1478–H1492.
- INESI G., 1985. Mechanism of calcium transport. *Annu. Rev. Physiol.* 47, 573–601.
- JANIAK r., LEWARTOWSKI B., LANGER G. A., 1996. Functional coupling between sarcoplasmic reticulum and  $\text{Na}/\text{Ca}$  exchange in single myocytes of guinea-pig and rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28, 253–264.
- KATZ A.M., 1992. *Physiology of the heart*. Raven Press, Ltd., New York.
- KENTISH J. C., BARSOTTI R. J., LEA T. J., MULLIGAN I. P., PATEL J. R., FERENCZI M. A., 1990. Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum induced by photorelease of calcium or  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . *Am. J. Physiol.* 258, H610–H615.
- KIEVAL R. S., BLOCH R. J., LINDENMAYER G. E., AMBESI A., LEDERER W. J., 1992. Immunofluorescence localization of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in heart cells. *Am. J. Physiol.* 263, C545–C550.
- KIHARA Y., GROSSMAN W., MORGAN J. P., 1989. Direct measurement of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Cir. Res.* 65, 1029–1044.
- KOMURA I., WENNINGER K. E., PHILIPSON K. D., IZUMO S., 1992. Molecular cloning and characterization of the human cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4769–4773.
- KURIHARA S., KONISHI M., 1987. Effect of  $\beta$  adrenoreceptor stimulation on intracellular Ca transients and tension in rat ventricular muscle. *Pflügers Arch.* 409, 427–437.
- LEE J. A., TAKAI A., ALLEN D. G., 1991. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, increases the calcium transient in isolated ferret ventricular muscle. *Exp. Physiol.* 76, 281–284.
- MCCORMACK J. G., HALESTRAP A. P., DENTON R. M., 1990. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 70, 391–425.
- MCIVOR M. E., ORCHARD C. H., LAKATTA E. G., 1988. Dissociation of changes in apparent myofibrillar  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and twitch relaxation induced by adrenergic and cholinergic stimulation in isolated ferret cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.* 92, 509–529.
- MORGAN J. P., BLINKS J. R., 1982. Intracellular Ca transients in the cat papillary muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 520–528.
- MOSS R. L., LAUER M. R., GINHON G. G., GREASER M. L., 1986. Altered  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibres following modification of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.*, 261, 6096–6099.
- MULLINS L. J., 1979. The generation of electric current in cardiac fibers by  $\text{Na}/\text{Ca}$  exchange. *Am. J. Physiol.* 236, C103–C110.
- NEGRETTI N., ONEIL S. C. O., ENISNER D. A., 1993. The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. *Cardiovascular Res.* 27, 1826–1830.
- NICOLL D. A., LONGONI S., PHILIPSON K. D., 1990. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Science* 250, 562–565.
- OTSU K., WILLARD H. F., KHANNA V. K., ZORZATO F., GREEN N. M., MACLENNAN D. H., 1990. Molecular cloning of cDNA encoding the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 13472–13483.
- POZZAN T., ZUTO R. R., VOLPE P., MELDESI J., 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74, 595–636.
- REUTER H., SEITZ N., 1968. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol. (London)* 195, 451–470.
- RINGER S. A., 1883. A further contribution regarding the influence of different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol. (London)* 4, 29–42.
- SCHULZE D., KOFUJI P., HADLEY R., KIRBY M. S., KIEVAL R. S., DOERING A., NIGGLI E., LEDERER W. J., 1993. Sodium/Calcium exchanger in heart muscle: molecular biology, cellular function, and special role in excitation-contraction coupling. *Cardiovasc. Res.* 27, 1726–1736.
- SINGER D., BIEL M., LOTAN I., FLOCKERZI V., HOFMANN F., DASCAL N., 1991. The role of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253, 1553–1557.
- TRIGGLE D. J., 1992. Biochemical and pharmacological differences among calcium channel antagonist: clinical implication, EPSTEIN M. (red.) *Calcium agonist in clinical medicine*, Philadelphia, Henley and Belfus, Inc.
- VORNANEM M., 1984. Activation of contractility and sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by  $\text{Ca}^{2+}$  during postnatal development of the rat heart. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A, 691–695.