

MTA DOKTORI PÁLYÁZAT
DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az elemi kalciumfelszabadulási események
morfológiája fiziológiás és kóros körülmények
között vázizmon**



Dr. Szentesi Péter

**Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet**

2025

Tartalomjegyzék

Fejezet	Oldalszám
1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
1.1 Az elektromechanikai kapcsolás	4
1.2 A rianodin receptor felépítése és szabályozása.....	5
1.3 Az elemi kalciumfelszabadulási események fajtái és tulajdonságai	6
1.4 Automatikus ECRE kereső algoritmusok	7
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	8
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK, MÓDSZERTANI FEJLESZTÉSEK.....	9
3.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára.....	9
3.2 Kalciumkoncentráció változás mérése konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal	9
3.3 Az elemi kalciumfelszabadulási események elemzése	10
3.3.1 A stationary wavelet transzformáció	10
3.3.2 Az egydimenziós (line-scan) képek elemzése.....	10
3.3.3 A kétdimenziós (XY) képek elemzése	11
4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	12
4.1 Elemi események fiziológias körülmények között emlősök, kételtűek és rovarok izomrostjain	12
4.1.1 ECRE-k patkányok harántcsíkolt izmon	12
4.1.2 ECRE-k békák harántcsíkolt izmain.....	12
4.1.3 ECRE-k egerek harántcsíkolt izmain	13
4.1.4 ECRE-k házi méhek harántcsíkolt izmain.....	13
4.2 A depolarizáció és különböző kalciumfelszabadulást befolyásoló anyagok hatása az elemi eseményekre	15
4.2.1 Depolarizáció és koffein hatása béka harántcsíkolt izmon	15
4.2.2 A nehézfém-ion kelátor TPEN hatása az ECRE-kre	16
4.2.3 A fenol származék timol hatása az ECRE-kre	16
4.2.4 A benzotiazepin származék K-201 hatása az ECRE-kre.....	17

4.2.5	Egy skorpió toxin hatása az ECRE-kre.....	17
4.2.6	A foszfatidilinozitol foszfát hatása az ECRE-kre.....	18
4.3	Elemi események nem fiziológiás körülmények között.....	19
4.3.1	ECRE-k szívinfarktuson átesett patkányok harántcsíkolt izmain...	19
4.3.2	ECRE-k hiperkoleszterinémiás patkányok harántcsíkolt izmain....	19
4.4	Elemi események változása génmódosítás hatására vázizomban.....	20
4.4.1	A Triadin fehérje szintjének hatása az ECRE-kre tenyésztett harántcsíkolt izomsejtekben	20
4.4.2	ECRE-k a természetes mutációval kialakult hipermuszkuláris egerek harántcsíkolt izomrostjaiban	21
4.4.3	Az embrionális DHPR jelenlétének hatása az ECRE-kre egerek harántcsíkolt izomrostjaiban.....	22
4.4.4	ECRE-k harántcsíkolt izomrostokban a miotubuláris miopátia egérmodellben.....	23
4.4.5	ECRE-k harántcsíkolt izomrostokban a centronukleáris miopátia egérmodelljében.....	24
4.4.6	Az Ankirin1 fehérje szintjének hatása az ECRE-kre egér harántcsíkolt izomrosjaiban.....	25
5.	ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	26
6.	A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK	28

1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A sejtek kalciumjelátviteli mechanizmusa meglepő módon egyszerre egyszerű és összetett abban az értelemben, hogy az egyatomos kalciumion (Ca^{2+}) az ismert legsokoldalúbb biológiai hírvivő. Gyors, tranziens Ca^{2+} -koncentrációváltozások közvetlenül szabályozzák például az izomösszehúzódást, a sejtmozgást, a hormonszekréción és az idegi jelátvitelt. Tartós Ca^{2+} -koncentrációemelkedés kulcsszerepet játszik számos biológiai folyamatban a megtermékenyítéstől a génexpresszióig át a sejthalálig. Mégis, mivel egy egyatomos kation, a Ca^{2+} csak egy biológiailag releváns formában létezik és biológiai információkódoló képessége szinte teljes egészében a célfehérjékhez történő kötődéséből és róluk leválásából származik, vagy mint biológiai membránokon keresztüli elektromos áramként jelenik meg. Mivel a Ca^{2+} a legjobban tanulmányozott az összes biológiai hírvivő közül, a róla feltárt eredmények alapvető ismeretekkel szolgálnak az intracelluláris jelátvitel alapelveit illetően.

Az elmúlt három évtizedben élénk kutatás folyt a lokális Ca^{2+} -jelátvitel megismerésére izmokban, idegsejtekben és más ingerelhető és nem ingerelhető sejtekben is. Az elemi kalciumesemények elemzéséből kapott ismeretek alapján eljutottunk olyan sokkal bonyolultabb rendszerek jobb megértéséhez, mint például az izomsejtek, neuronok, de még egyes nem ingerelhető sejtek is.

A tézisekben leggyakrabban elforduló két angol kifejezést nem a magyar megfelelőjeként fogom használni. Az első a „ Ca^{2+} *spark*”, amit a lokalizált Ca^{2+} -felszabadulási események általános elnevezéseként használják molekuláris eredetüktől vagy sejttypusuktól függetlenül. A másik ilyen kifejezés a „ Ca^{2+} ember”, amit úgy definiálnak, hogy alacsony intenzitású megnyúlt *spark*. Mivel az „ember” a magyar nyelvben is megtalálható szó, a félreértések elkerülése érdekében a tézisekben mind a *spark*, mind az *ember* szavakat dőlten fogom szedni, ha elemi kalciumfelszabadulásról lesz szó.

1.1 Az elektromechanikai kapcsolás

Vázizomban az elektromechanikai kapcsolás (ECC) során a szarkolemmán érkező elektromos jel (akcióspotenciál) több lépésen keresztül alakul át kontrakciós válasszá.

A motorneuronból érkező akcióspotenciál végig terjedve a szarkolemmán bejut a transzverzális (T-) tubulusokba, ahol aktiválja a vázizom feszültség érzékelőit, a

négyes csoportokban (tetrád) elhelyezkedő L-típusú kalciumcsatornákat (dihidropiridin receptorok, DHPR vagy CaV1.1). Ezek konformáció változása idézi elő a szarkoplazmatikus retikulum (SR) terminális ciszternájában található kalciumcsatornákat, a rianodin receptorok (RyR) megnyílását és az SR-ben tárolt Ca^{2+} felszabadulását. Tehát négy DHPR és egy RyR alkot egy kalciumfelszabadító egységet (Calcium Release Unit, CRU), ami a két különálló membrán (szarkolemma és SR) találkozásánál jön létre. Fiziológiás körülmények között emlős vázizomrostokban a kontrakcióhoz szükséges kalcium teljes egészében az intracelluláris raktárból (SR) származik, külső, extracelluláris kalcium belépésére nincs szükség.

1.2 A rianodin receptor felépítése és szabályozása

A rianodin receptor a ma ismert legnagyobb molekula tömegű (kb. 2 MDa) homotetramer szerkezetű alacsony szelektivitású kation csatorna, nagy konduktanciával. A receptor névadó agonistája a rianodin, egy mérgező növényi alkaloida, amit a Dél-Amerikai *Ryania speciosa*-ból izoláltak és már régóta rovarirtó szerként használják. Vázizomban elsődlegesen Ca^{2+} -csatornaként funkcionál, feladata nagy mennyiségű Ca^{2+} gyors kiengedése az SR-ből. A rianodin receptornak emlősökben 3 izoformája ismert: a RyR1 legnagyobb számban a vázizomzatban fordul elő, a RyR2 a szívizomban, a RyR3 pedig döntően az agyban, illetőleg az embrionális vázizomban is megtalálható. Ez utóbbi a kifejlett izomból szinte teljesen eltűnik, csak a rekeszizomban és a szemmozgató izomban marad meg kis. A RyR1 egy nagy intracelluláris és egy kisebb, az SR membránban elhelyezkedő részből áll.

Vázizomban a RyR1-k sakktábla-szerűen rendeződnek el: minden RyR1-hez négy másik kapcsolódik a "sarkoknál". Csak minden második RyR1 lép kapcsolatba DHPR-rel. A vázizomban a CICR a DHPR kalciumcsatorna közreműködése nélkül jön létre, és a RyR1-n keresztüli kalciumfelszabadulás aktiválja a szomszédos, a DHPR-rel kapcsolatban nem álló RyR1-eket.

A RyR1 nyitását fiziológiásan alapvetően maga a kalcium szabályozza: intracellulárisan nM-os koncentráció aktiválja, μM -os koncentráció gátolja (a RyR1 nagy affinitású Ca^{2+} -kötőhelye aktivál, míg alacsony affinitású Ca^{2+} -kötőhelye gátol). Emellett az SR belső Ca^{2+} -koncentrációja is szabályozó szereppel bír: a magas SR Ca^{2+} -koncentráció fokozza a RyR1 nyitvatartási valószínűségét a belső (luminális) oldalán található Ca^{2+} -kötőhely telítettségén keresztül.

Számos, főleg a csatornához közvetlenül kötődő fehérje szabályozza a rianodin receptort. Ilyen például a Kalszekvesztrin (CSQ), ami az SR kalciumtároló fehérjéje, valamint a Triadin, ami egy transzmembrán fehérje a SR-ben.

A kételtűek RyR izoformái (RyR α és RyR β) hasonlóak az emlős RyR1-hez és RyR3-hoz, mind aminosavsorrendjük, mind funkcionális szempontból. Az α izoforma szorosan kapcsolódik a T-tubulus feszültségérzékelőjéhez (DHPR-ek) és feszültségvezérelt. A β izoforma nem kapcsolódik DHPR-ekkel, de már az intracelluláris kalciumkoncentráció kismértékű növekedése is megnyithatja.

1.3 Az elemi kalciumfelszabadulási események fajtái és tulajdonságai

Az elemi kalciumfelszabadulási esemény (ECRE, Elementary Calcium Release Event) a jelenleg ismert kisebb részekre nem bontható, lokális intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációemelkedés: egy rianodin receptor-csoport megnyílásának eredményeként felszabaduló Ca^{2+} mennyisége. A rövid ideig tartó, nagy amplitúdójú, spontán Ca^{2+} -felszabadulási eseményt (*spark*) először Cheng és mtsai írták le szívizmon 1993-ben. Később kételtűek intakt harántcsíktolt izomrostjain is nagyszámú *spark*-ot figyeltek meg. Emlős intakt vázizomrostokon ellenben a spontán ECRE-k jóval ritkábban fordulnak elő. Az embrionális emlős vázizomrostokon még lehet spontán *spark*-ot regisztrálni, ennek oka a RyR1 és RyR3 együttes jelenléte. Az izom fejlődése során a RyR3 eltűnésével a spontán elemi események is egyre ritkábban figyelhetők meg. Mivel a béka vázizomrostjaiban a RyR-nek két olyan izoformája található meg, amelyek hasonlítanak az emlős izom RyR1-re (RyR α) és RyR3-ra (RyR β) izoformáira, ezzel magyarázhatjuk, hogy rajtuk nagyszámú *spark* figyelhető meg. Vázizmon létezik egy kis amplitúdójú hosszan tartó spontán Ca^{2+} -felszabadulási esemény is (*ember*).

A jelenleg elfogadott elmélet szerint a számos, térben és időben egyszerre megjelenő *spark* alatt mérhető lokális Ca^{2+} -koncentrációemelkedés összeadódása következtében jön létre a globális intracelluláris Ca^{2+} -tranziens, ami a sejtek extracelluláris ingerekre adott intracelluláris válaszának egyik közös jelátviteli útja. A *spark* megjelenési formája és gyakorisága az együttműködő RyR1-k kapuzási mechanizmusát követi, ezért közvetve a CRU-k működéséről szolgáltat információt.

Mind kételtűek, mind emlősök vázizmán a leggyakoribb elemi esemény a *spark*. A *spark* a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció időben rövid: általában 10-20 ms ideig tartó; térben erősen lokalizált (2-3 μm) átmeneti emelkedése. Jellemzői a rövid kialakulási

idő (Time To Peak vagy Rise Time), az exponenciális lecsengés a csúcs után, és hogy a térbeli kiterjedése Gauss-eloszlást követ. A *spark*ot kb. 20-30 db RyR1 egyszerre történő megnyílásának eredményeként tekintjük, a nyitott csatornák száma egy elemi esemény során állandó. Megszűnésében szerepet játszhat az SR lokális Ca^{2+} kiürülése mellett az emelkedett Ca^{2+} -koncentráció RyR1 csatorna-funkciót gátló hatása. Kételtűek vázizomrostjain egy *spark* során az SR terminális ciszternái Ca^{2+} -tartalmának kb. 7%-a szabadul fel.

Emlős vázizomrostokon az elemi kalciumfelszabadulási események kb. 65%-a *spark*, míg a többi *ember*, vagy a kettő kombinációja. Emlősök esetén az *embert* tekintjük az abszolút elemi eseménynek, mivel jelenleg egy RyR1 megnyílásának a következményének tartják. Az *ember* térbeli kiterjedése nagyon hasonló a *spark*hoz, azonban időben sokkal hosszabb és kisebb az amplitúdója.

1.4 Automatikus ECRE kereső algoritmusok

Az elemi kalciumfelszabadulási esemény csak speciális, nagy térbeli és időbeli felbontású mérési technika mellett rögzíthető és ábrázolható: felfedezését a konfokális mikroszkópia fejlődése tette lehetővé. Ez a mérési módszer kis térfogatban ($0,2 \times 0,2 \times 0,4 \mu\text{m}^3$) képes követni fluoreszcencia változásokat. Emellett elengedhetetlen volt olyan fluoreszcens kalciumindikátorok előállítása is, amelyeknek kellően magas a kalciumérzékenysége ahhoz, hogy a kis amplitúdójú Ca^{2+} -koncentrációemelkedés is mérhető fluoreszcencia-intenzitás-változást okozzon.

A nagyszámú elemi kalciumfelszabadulási esemény konfokális mikroszkópos képeken történő megtalálására már a kezdetektől automatikus felismerési módszereket fejlesztettek ki. A legtöbb ilyen módszer kettős küszöbölési algoritmuson alapul (ezt hagyományos módszernek is nevezik). Azonban az eseménymorfológia sokfélesége (pl. emlős vázizomrostokon az *emberek* és kevert típusú események jelenléte), valamint a mérőrendszerenként változó zajmintázatok miatt sűrűn előforduló megbízhatatlan észlelés miatt, az algoritmus fejlesztésének hangsúlya az interaktív eljárások felé fordult.

Az előbb említett nehézségek leküzdése érdekében kezdték el használni a wavelet-en alapuló módszereket az utóbbi években a képek minőségének javítása és alakzat-felismerés miatt. A wavelet transzformációval a mért jelek időbeli, térbeli és a frekvencia-tartományon belüli elemzése a hagyományos módszerekkel szemben egylépésben hajtható végre. A wavelet módszert az 1980-as évek közepétől kezdve

fejlesztették ki és az orvosi képalkotásban a képek javítására, zajcsökkentésre és tárgyfelismerésre használják. Bár az „à trous” („lyukas”) wavelet transzformációnak kiváló képjavító és tárgyfelismerési jellemzői vannak zajos képeken, ahhoz, hogy teljes mértékben automatikus esemény észlelést biztosítson, az algoritmus paramétereit megfelelően kell beállítani. A teljesen automatikus és felhasználói beavatkozást nem igénylő képfeldolgozó algoritmusok fejlesztése tehát továbbra is napirenden van.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A vázizomrostok izolálásának kidolgozása ízeltlábú (házi méh), kétéltű (béka) és emlős (egér, patkány) vázizmaiból. Az optimális mérési protokollok megtalálása.
2. Automatikus ECRE felismerő algoritmus és program kifejlesztése, ami lehetővé teszi vonalmenti és kétdimenziós pásztázással készült konfokális mikroszkópos felvételeken nagyszámú esemény automatikus detektálását és elemzését.
3. Az ECRE-k időbeliségének vizsgálata nagy időbeli felbontású mérésekben.
4. Az ECRE-k tanulmányozása miotóniákban, hipermuszkularitásban, embrionális DHPR jelenlétében és vázizmokban fiziológiásan jelenlevő fehérjék hiányában.
5. Az ECRE-k változásának vizsgálata nem vázizom-betegségekben.
6. Az ECRE-k megfigyelése depolarizáció és farmakológiai befolyásolás esetén.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK, MÓDSZERTANI FEJLESZTÉSEK

3.1 Vázizomrostok izolálása fluoreszcens kalciumindikátorral végzett konfokális lézerpásztázó mikroszkópos mérések számára

Az intracelluláris kalciumkoncentráció mérésekhez minden esetben egyedi vázizomrostokat használtunk. Emlősökből először patkányból sikerült egyedi sérülésmentes (intakt) vázizomrostot előállítanunk. Másokkal párhuzamosan beállítottunk egy enzimátikus emésztési eljárást, amit később sikeresen adaptáltuk egerekre is. Patkány esetében az *extensor digitorum communis*, míg egéرنél a *flexor digitorum brevis* izmot használtuk.

A háziméhek izomrostjainak preparálásához még röpképtelen fiatal egyedeket használtunk. A *tibia* szemészeti ollóval nyitottuk fel és enzimátikus emésztéssel szabadítottuk ki az izomrostokat a kötőszövetből.

A mérésekben intakt vagy permeabilizált rostokat használtunk. Az intakt rostokon a festékek AM (acetoxi-metilészter konjugált) formáját alkalmaztuk. A permeabilizálás során az intakt rostokat detergenst (esetünkben szaponint) tartalmazó külső oldatba helyeztük. Amint a felszíni membrán kezdett átjárhatóvá válni, egyre több festék jutott a rostok belsejébe és végül kialakult az egyensúlyi állapot a rost belső és külső tere között. A mérés előtt a mérőkádat detergens mentes belső oldattal töltöttük fel.

Az általunk használt vázizomrostok preparálásának leírása és a méréseink pontos módszertana részletesen a következő publikációkban található meg: béka (Cserne Szappanos és mtsai., 2020; Szentesi és mtsai., 2004; Sztretye és mtsai., 2009), patkány (Szentesi és mtsai., 1997, 2004; Szigeti és mtsai., 2007), egér (Fodor és mtsai., 2008; Sztretye és mtsai., 2009), háziméh (Collet és mtsai., 2021).

3.2 Kalciumkoncentráció változás mérése konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal

Az alábbiakban bemutatásra kerülő vizsgálatainkban a Zeiss LSM 510 Meta és a Zeiss LIVE konfokális lézerpásztázó mikroszkópokat (Zeiss, Oberkochen, Németország) használtuk. Míg a META rendszerben pont-szkenner pásztázza a preparátumot, addig LIVE rendszerben egy vonal-szkenner tapogatja le a mérendő

tárgyat. Az utóbbi technika segítségével akár 100 szoros sebesség növekedés is elérhető a META rendszerhez képest. Méréseink során kétfajta pásztázási módot alkalmaztunk: kétdimenziós (XY) képsorozatok, vonalmenti pásztázás (line-scan).

3.3 Az elemi kalciumfelszabadulási események elemzése

3.3.1 A stationary wavelet transzformáció

A konfokális mikroszkóppal készült mérési képek feldolgozására Waveletet transzformációs módszert használtunk. Az stationary wavelet transzformáció (SWT), vagy másik nevén *à trous* („lyukas”) wavelet transzformáció a diszkrét wavelet transzformációk egyik fajtája. A bemenő jelet a transzformáció különböző összetevőkre bontja, majd egy felüláteresztő szűrő adja meg a wavelet-együtthatókat az első szinten, míg egy aluláteresztő szűrő alkalmazása után megkapjuk a bemenő jelet a következő transzformációs ciklus számára. A bemenő jel (esetünkben egy kép) különböző „részletességi szintekre” való bontását a transzformációs ciklus előre megadott véges számú futtatása után kapjuk meg. Az algoritmus pontos leírása a tézisekben felhasznált egyik cikkben található meg (Szabó és mtsai., 2010).

3.3.2 Az egydimenziós (line-scan) képek elemzése

Line-scan képek esetében a fluoreszcencia intenzitást $[F(t)]$ az eltelt idő (t) függvényeként ábrázoljuk. A mért értékeket a háttérfluoreszcenciára normalizált fluoreszcencia intenzitásként $[F(t)/F_0]$ jelenítjük meg. Az alapfluoreszcencia intenzitást $[F_0]$ olyan időintervallumban végzett átlagolásával nyertük, ahol a vizsgált időintervallumban nem történt semmilyen intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozás. A normalizált képeken ezután wavelet transzformációval zajszűrést végeztünk. A *spark*okat a 2-es és 3-as, míg az *ember*eket a 4-es wavelet szinten tudtuk detektálni.

A *spark* felszálló és a leszálló szárra is exponenciális függvényt illesztettünk. A *spark* térbeli kiterjedését Gauss függvénnyel írtuk le. Az illesztések után a kapott görbék félérték-szélessége lesz a *spark*okat jellemző félérték-szélesség paramétere: FTHM (időbeli, Full Time at Half Maximum); FWHM (térbeli; Full Width at Half Maximum). Az idő profil felszálló szárának illesztéséből meghatározható a *spark* csúcsának eléréséhez szükséges idő (Time to Peak), míg a leszálló szár illesztéséből a megszűnésének ideje (Falling Time). A kettő összege fogja megadni a *spark* időbeli hosszát (duration). Végezetül kiszámolható az egy *spark* alatt az SR-ből kiszabadult Ca^{2+} mennyisége (Signal Mass), amit térfogati integrálással határoztunk meg.

Az *ember*hez három jellemző paramétert rendelünk hozzá: átlagos amplitúdó,

térbeli félérték-szélesség (FWHM), időtartam (duration). Az *ember* térbeli profiljára Gauss függvényt illesztve megkaptuk az FWHM értéket. Az átlagos amplitúdó 80%-át meghaladó időpontok értékét pedig az időtartamnak (duration) tekintettük. Mindkét típusú eseményre vonatkozó számolások részletesen megtalálhatóak a tézisek alapját képező cikkben (Szabó és mtsai., 2010).

3.3.3 A kétdimenziós (XY) képek elemzése

Az elemzés első lépéseként meghatároztuk a képen a rost által lefedett terület és eltávolítottuk a rost strukturális részeit jelentő képpontokat. Az elemzés legelső lépésében a kép minden egyes képpontjára meghatároztuk az adott képpontra érvényes alap fluoreszcencia értéket. Ezután az egyes képpontokhoz tartozó idősorokat az egydimenziós SWT-val komponenseire bontottuk, majd ennek segítségével felüláteresztő szűrést végeztünk. Az F4-es wavelet együtthatóval elosztva az idősor összes adatát kiszűrtük az igen lassú kinetikájú nem elemi kalciumfelszabadulásból származó kalciumszint-változásokat. A számolások részletesen megtalálhatóak a tézisek alapját képező cikkben (Cserne Szappanos és mtsai., 2020).

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1 Elemi események fiziológiás körülmények között emlősök, kétéltűek és rovarok izomrostjain

4.1.1 ECRE-k patkányok harántcsíkolt izmon

Patkányok enzimatikusan izolált *extensor digitorum communis* izomrostjain kezdtük az ECRE-k tanulmányozását (Szentesi és mtsai., 2004). A patkány izomrostokon változó morfológiájú kalciumfelszabadulási eseményeket találtunk. A *spark*ok mellett megtalálhatóak voltak a hosszú kis amplitúdójú *emberek* és ezek együttes előfordulása is. Az önálló *spark*ok átlagos amplitúdója $0,92 \pm 0,01$ F/F₀ volt, térbeli félérték-szélességük (FWHM) $1,81 \pm 0,03$ μ m-nek, míg hosszuk időben 56 ± 1 ms-nak adódott. Az önálló *emberek* átlagos amplitúdója a *spark*októl jóval kisebb volt ($0,210 \pm 0,004$ F/F₀), térbeli kiterjedésük viszont megegyezett a *spark*okéval (FWHM $1,76 \pm 0,03$ μ m), azonban az átlagos hosszuk jóval nagyobb volt (87 ± 2 ms). Az ECRE-k frekvenciája alacsony ($0,059 \pm 0,002$ 1/s/szarkomer) volt és nagyjából 60% volt önálló *spark*, míg a többi az *emberek* valamelyik formája.

4.1.2 ECRE-k békák harántcsíkolt izmain

Az elemi kalciumfelszabadulási események tanulmányozását békákon folytattuk (Sztretye és mtsai., 2009).

Kecskebékák (*Rana esculenta*) *semitendinosus* izmából manuálisan preparált intakt harántcsíkolt izomrostjain lényegesen több *spark*ot találtunk, mint patkány izomrostokon. Viszont soha nem láttunk *embert* kontroll körülmények között. A *spark*ok átlagos amplitúdója a patkányokéhoz hasonló ($0,84 \pm 0,01$ F/F₀), de FWHM-je szélesebb ($2,16 \pm 0,02$ μ m), míg hossza rövidebb ($34,8 \pm 0,3$ ms) volt. Az események frekvenciája $0,19 \pm 0,02$ 1/s/szarkomer volt, ami nagyjából háromszorosa a patkány izomrostokon megfigyelteknek.

A kísérleteket megismételtük a nagysebességű vonal-szkenner ZEISS LIVE konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal északi leopárd béka (*Rana pipiens*) enzimatikusan izolált intakt *flexor digitorum brevis* izomrostjain (Cserne Szappanos és mtsai., 2020). Az így mért *spark*ok átlagos amplitúdója $0,188 \pm 0,001$ F/F₀, FWHM-X $1,725 \pm 0,005$ μ m, FWHM-Y $1,508 \pm 0,004$ μ m és frekvenciája $0,19 \pm 0,02$ 1/ms/mm² volt (6164 esemény). Ebből a méréssorozatból meg tudtuk állapítani, hogy a *spark*ok aszimmetrikusak és szélesebbek az izomrost hossz tengelyével párhuzamosan.

A két méréssorozat lényegesen különböző átlagos *spark* amplitúdót adott. Ennek több oka is lehet. Az egyik lényeges eltérést a preparátumban találjuk. Intakt rostokon kisebb *spark*okat kaptunk, mint a permeabilizált, vagyis a felszíni membrántól, így a dihidropiridin receptor kontrolljától felszabadult rianodin receptorokon keresztül kialakuló események esetében. A másik jelentős különbség a mérés metodikájában rejlik. A LIVE konfokális mikroszkóp rendszer gyorsabb és így több kisebb amplitúdójú eseményt rögzít a képeken.

4.1.3 ECRE-k egerek harántcsíkolt izmain

Mivel az izombetegségek tanulmányozására egyre több egér modell vált elérhetővé, az elemi kalciumfelszabadulások patkányokra kidolgozott mérési módszerét adaptálnunk kellett erre a speciesre (Bodnár és mtsai., 2014). Egerek *flexor digitorum brevis* izmából enzimatikusan izolált rostokon végeztük az ECRE-k vizsgálatát.

A *spark*ok mellett a patkányokhoz hasonlóan itt is megjelentek az *emberek*. Az egyedül álló *spark*ok átlagos amplitúdója jóval kisebb volt ($0,165 \pm 0,001 F/F_0$), mint a patkányok esetében. A térbeli kiterjedésük (FWHM $1,92 \pm 0,01 \mu m$) és hosszuk ($40,0 \pm 0,3 ms$) azonban megegyezett a patkányokban mértekkel. Az önálló *emberek* átlagos amplitúdója ($0,160 \pm 0,003 F/F_0$) és térbeli kiterjedésük (FWHM $1,85 \pm 0,01 \mu m$) a *spark*okhoz hasonló volt. Viszont az átlagos hosszuk ($159,4 \pm 5,2 ms$) több mint duplájának adódott, mint a patkányok esetében. A *spark*ok előfordulásának frekvenciája $0,48 \pm 0,03 Hz$, míg az *embereké* $0,38 \pm 0,03 Hz$ volt.

4.1.4 ECRE-k házi méhek harántcsíkolt izmain

Az elemi kalciumfelszabadulási események mérései során a kétéltűeken és emlősökön felhalmozott tapasztalataink felhasználásával megpróbáltuk ízeltlábúak harántcsíkolt izmainak preparálását is (Collet és mtsai., 2021). A házi méh harmadik lábpárjából származó tibiákból enzimatikusan izolált spontán aktív izomrostokon mért XY képsorozatokon klasszikus *spark*okat találtunk. A 25 db roston mért 4898 db esemény analízise alapján az átlagos amplitúdó elég alacsony ($0,220 \pm 0,001 F/F_0$) volt a békákon tapasztaltakhoz képest. Azonban néhány *spark* esetében az amplitúdó elérte a $0,5 F/F_0$ értéket. Az események átlagos frekvenciája nagyon nagy volt ($1696 \pm 367 Hz/mm^2$). A rostra merőleges átlagos szélesség (FWHM-X, $3,73 \pm 0,02 \mu m$) és a rosttal párhuzamos átlagos szélesség (FWHM-Y, $3,30 \pm 0,02 \mu m$) nagyobbak adódott a béka és emlős izomrostokon megszokott értéknél. Találtunk néhány

eseményt, amely nagy területre terjedt ki ($\text{FWHM} > 10 \mu\text{m}$). A *sparkok* alakja nem volt tökéletes kör, az átlagos $\text{FWHM-X}/\text{FWHM-Y}$ hányados szignifikánsan nagyobb volt, mint 1 ($1,22 \pm 0,01$; $p < 0,001$). Kiszámoltuk az események alatt felszabadult Ca^{2+} mennyiségét (Signal Mass, SM) is, amelynek átlagos értéke $14,52 \pm 0,29 \mu\text{m}^3$ volt.

Az események morfológiájának részletes analízise céljából line-scan méréseket is végeztünk 22 db aktív izomroston. Az emlős izomrostokon látottakhoz hasonlóan, találtunk *sparkokat* és *embereket* is. Ezek aránya nagyjából 2:1 volt. Míg a kétfajta esemény átlagos amplitúdója azonosnak adódott, az *emberek* lassabban alakultak ki és térben szélesebbek voltak, mint a *sparkok*, így az átlagos Signal Mass is nagyobb volt esetükben.

Összegzés képpen megállapíthatjuk, hogy a méhek lábából izolált harántcsíkolt izomrostokon a gerincesek izomrostjain mért ECRE-khez hasonló spontán *sparkok* és *emberek* alakulnak ki. Így feltételezhetjük, hogy méhekben is ezek az elektromechanikai kapcsolat alap kalciumfelszabadulási eseményei (Collet és mtsai., 2021).

4.2 A depolarizáció és különböző kalciumfelszabadulást befolyásoló anyagok hatása az elemi eseményekre

4.2.1 Depolarizáció és koffein hatása béka harántcsíkolt izmon

A kételtűek vázizomrostjain a *sparkok* egyaránt lehetnek feszültségfüggő és feszültségtől független, ligandum által aktivált kalciumfelszabadulási események. Azonban, az hogy ezek tulajdonságai és eredetük hasonlóságokat mutat-e, még mindig vita tárgyát képezi. Ennek tisztázására békák intakt izomrostjain megemelt KCl tartalmú oldatokat használtunk a nyugalmi membránpotenciál kismértékű depolarizációjára és a dihidropiridin receptorok aktiválására, míg koffeint a rianodin receptorok (RyR) megnyitására (Cserne Szappanos és mtsai., 2020). Mindkét kezelés növelte a *sparkok* előfordulásának gyakoriságát és megváltoztatta azok morfológiáját.

A *sparkok* amplitúdója és a teljes szélességük a maximum felénél szignifikánsan nagyobb volt a koffeinkezelés után, mint a depolarizált sejteken. A depolarizáció mellett alkalmazott koffein kezelés tovább növelte az események számát, de a többi paraméter értékét már nem változtatta meg lényegesen a depolarizáció nélküli koffeinadagoláshoz képest. A depolarizált rostokon észlelt *sparkok* nagyjából 10%-a és a koffeinnel aktivált *sparkok* egyharmada tovaterjedő volt (több egymást követő mérési képen is megjelent). A *sparkok* vándorlása – amit az egymást követő képeken a középpontjuk elmozdulásaként határoztunk meg – lényegesen hosszabb volt az egymást követő képkockák között koffeinkezelés után, mint depolarizáció hatására.

A depolarizált vagy koffeinnel kezelt rostokon az XY mérésekben megjelenő nagyszámú *spark* lehetővé tette, hogy megvizsgáljuk, az események megjelenésének helye hogyan oszlik meg az egyes rostokban. Ha sok esemény alakul ki egy izomroston, akkor azok egyenletesen eloszlának a vizsgált területen.

Eredményeink arra utalnak, hogy a békák vázizmában található kétféle rianodin receptor, a DHPR-ek által szabályozott junkcionális és a feszültség független parajunkcionális RyR-ek, egymástól függetlenül aktiválódnak, alternatív módokon, de fennállhat az együttműködés lehetősége (CICR) a szomszédos kalciumcsatornák között. Valamint a *sparkok* egyenletesen oszlanak el anélkül, hogy frekvenciált területek alakulnának ki a vázizomrostokban (Cserne Szappanos és mtsai., 2020).

4.2.2 A nehézfém-ion kelátor TPEN hatása az ECRE-kre

Bizonyos körülmények között a *sparkok* keletkezési helyükről tovaterjedhetnek. Ennek részletes vizsgálatára egy kalciumkelátort, a TPEN-t használtuk (Sztretye és mtsai., 2009). A TPEN (N,N,N,N-tetrakis(2-piridil-metil)-etilén-diamin) egy membránpermeabilis nehézfém-ion kelátképző, amelynek a Ca^{2+} -ra vonatkozó disszociációs állandója hasonló az intracelluláris raktárak kalciumkoncentrációjához. Békák permeabilizált vázizomrostjain 50 μM TPEN növelte a *sparkok* számát és tovaterjedő eseményeket okozott $273 \pm 7 \mu\text{m/s}$ átlagos terjedési sebességgel. Ez az aktiváló hatás azonban patkány vázizomrostokon nem volt megfigyelhető. Az amúgy is alacsony frekvenciával megjelenő *sparkok*at a TPEN tovább ritkította emlős izomrostokon.

A tovaterjedő *sparkok* megjelenése békák vázizomrostjain bizonyítja, hogy a CICR működik kétéltűek vázizmaiban. Ez a megfigyelésünk tovább erősíti azt a feltételezést, hogy a CICR kialakulásának feltétele a békák izmaiban megtalálható, nem feszültség-vezérelt (parajunkcionális) RyR-ek jelenléte. A *sparkok* általunk kiszámolt terjedési sebessége pedig jó becslést ad a kalcium diffúziós sebességére a citoszólban (Sztretye és mtsai., 2009).

4.2.3 A fenol származék timol hatása az ECRE-kre

A TPEN-nel folytatott kísérleteinkben soha nem találtunk *embert* a kalciumfelszabadulási események között patkány izomrostokon. Ezzel szemben, amikor a fenol származék timollal kezeltük az emlős izomrostokat, nagyszámú alacsony amplitúdójú hosszú eseményt láttunk (Szentesi és mtsai., 2004).

Kontroll körülmények között az elemi események mintegy 63% volt *spark*, míg a maradék események vagy tisztán *ember*, vagy a két esemény típus keverékeként jelentek meg. Timol alig változtatta meg az események frekvenciáját ($58,7 \pm 2,0$ 1/ms/szarkomer-ről $65,4 \pm 1,6$ 1/ms/szarkomer-re), de csökkentette amplitúdójukat és megnövelte a hosszukat. Timol jelenlétében nagyon hosszan tartó eseményeket is regisztráltunk. Ezek az eredmények közvetlen kísérleti bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy egyetlen rianodin csatorna megnyílása *embert* eredményez, nem pedig *sparkot* emlősök vázizomrostjában. Továbbá a különböző típusú események alatt felszabadult kalcium mennyiségéből az is megbecsülhető volt, hogy kb. 30 csatorna egyidejű megnyílása hoz létre egy átlagos *sparkot* (Szentesi és mtsai., 2004).

4.2.4 A benzotiazepin származék K-201 hatása az ECRE-kre

A timolhoz hasonlóan, a klinikai gyakorlatban használt számos vegyületről írták már le, hogy befolyásolja az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -t. Ezek közül mi a antiaritmiás hatású benzotiazepin származék K-201 hatásait vizsgáltuk a RyR1-re (Almassy és mtsai., 2008). A K-201 megváltoztatta az elemi kalciumfelszabadulási események gyakoriságát emlős vázizomrostokban: a *sparkok* frekvenciája lecsökkent, míg az *embereké* nőtt. Továbbá különböző amplitúdójú illetve lépcsős *emberek* jelentek meg a szer hozzáadása után a RyR1 szubkonduktancia állapotainak megfelelően.

1 μ M K-201 szignifikánsan csökkentette a *sparkok* amplitúdóját, ami arra utal, hogy az eseményhez hozzájáruló csatornák átlagos száma jelentősen csökkent. Az ismert, hogy az ECRE nincs jelen ép emlős rostokon, ezért az aktiválódó csatornák számának csökkenése úgy is értelmezhető, mint a szernek a csatornát stabilizáló hatása. Mivel a szerről kimutattuk azt, hogy a SERCA-ra is hat, az ECRE-k számára és morfológiájára gyakorolt hatását nem tekinthetjük csak a RyR1-re kifejtett hatásnak. A kísérletsorozat zárásaként megvizsgáltuk a szert postinfarktusos patkányok vázizomrostjain is és a kontroll állatokhoz hasonló eredményeket kaptunk (Almassy és mtsai., 2008).

4.2.5 Egy skorpió toxin hatása az ECRE-kre

Az ECRE-k farmakológiai befolyásolhatóságának vizsgálatát egy skorpió toxinnal folytattuk (Lukács és mtsai., 2008). A *Scorpio maurus palmatus* toxinjából izolált 33 aminosavból álló Maurokalcin (MCA) fehérje azért került az izomkutatók érdeklődésének középpontjába, mert aminosav szekvenciája nagyon hasonlít a dihidropiridin receptor azon részéhez, amivel a rianodin receptorhoz kötődik.

Munkánk során patkányok és békák vázizomrostjain vizsgáltuk a toxin kalciumfelszabadulásra kifejtett hatásait. A MCA (50 nM) adagolásának kezdetén, akut hatásként fokozódott a csatorna megnyílása, ami az elemi események megnövekedett számában mutatkozott meg. A *sparkok* átlagos amplitúdója a kontroll $0,86 \pm 0,01 F/F_0$ -ról $0,46 \pm 0,01 F/F_0$ -ra csökkent MCA hatására, mert a toxin egy csökkentett vezetőképességű, bár tartósan meglévő csatornaállapotot hozott létre a RyR1-on, miközben az FWHM változatlan maradt (kontroll: $1,84 \pm 0,03 \mu$ m; MCA adagolás után: $1,84 \pm 0,02 \mu$ m). A toxin hosszan tartó alkalmazása az izomrostokon olyan ritkán kialakuló, de hosszantartó (301 ± 12 ms, $n=102$) kalciumfelszabadulási eseményeket hozott létre, amelyek egyáltalán nem voltak megtalálhatóak kontroll körülmények

között. Egy korábbi kutatás felhívta a figyelmet a M_{Ca} 24. pozíciója körüli aminosavakra, mint lehetséges kölcsönhatási helyekre a peptid RyR1-hez kötődése során. Ezért megvizsgáltuk e pozíció és tőle távolabbi aminosavak Alaninra történő cseréjének hatását a toxin aktivitására. Az [Ala²⁴]M_{Ca} mutáns még a magas 500 nM-os koncentrációban sem befolyásolta az elemi Ca²⁺-felszabadulási eseményeket és nem alakultak ki *emberek* sem. Ahogy távolodott a mutáció a 24. aminosavtól, egyre több *ember* alakult ki.

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a Maurocalcin aktiválja RyR1-t, így fokozza a Ca²⁺-felszabadulást a belső kalciumraktárból. Aminosavcserével módosítható a toxin hatékonysága: például az [Ala²⁴]M_{Ca} mutánsnak a receptorkötődésben szerepet játszó fehérjeszakasza annyira megváltozik, hogy a toxin elveszíti a RyR1 aktiválásához szükséges képességét. Azonban ha a mutáció helye távolodik a 24. aminosavtól, a toxin hatása egyre jobban megközelíti a vad típusú peptidét (Lukács és mtsai., 2008).

4.2.6 A foszfatidilinozitol foszfát hatása az ECRE-kre

Eddig bemutatott vizsgálatainkban exogén szerek hatását tanulmányoztuk az ECRE-kre. Azonban néhány kórfolyamat hatására egyes endogén ligandok szintje is változhat és hatással lehet az [Ca²⁺]_i-ra, így az elemi kalciumfelszabadulási eseményekre is. Egy súlyos genetikai izombetegségben, az X-kapcsolt miotubuláris miopátiában a MTM1-t (miotubularin) kódoló gén mutációit írták le. A foszfatidilinozitol foszfát (PtdInsP) foszfatázok szubsztrátjai vagy hidrolizált termékei az MTM1-nek. Így az egyik kézenfekvő magyarázat az ECC hibás működésére, a MTM1 PtdInsP-foszfatáz aktivitás megváltozása lehet. Ezért megvizsgáltuk, hogy a PtdInsP-k fiziológias körülmények között részt vesznek-e a [Ca²⁺]_i és ECC szabályozásában egészséges izomban (González Rodríguez és mtsai., 2014).

Permeabilizált egér vázizomrostokon jelentősen csökkent az észlelt ECRE-k száma PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(3)P és PtdIns(5)P jelenlétében és a legnagyobb hatást a PtdIns(3,5)P₂ esetén találtuk. Az átlagos ECRE amplitúdó enyhén, de szignifikánsan megnövekedett PtdIns(5)P jelenlétében, míg az FWHM mind az x, mind az y irányban ~10%-kal csökkent PtdIns(3,5)P₂ jelenlétében. Összességében a tesztelt PtdInsP-k csak kismértékben befolyásolták az ECRE-k amplitúdóját és térbeli tulajdonságaikat, miközben jelentősen csökkentették az események előfordulását. Az eredmények alátámasztják azt a lehetőséget, hogy az MTM1 szubsztrátok kóros felhalmozódása

csökkentheti a rianodin receptoron keresztül Ca^{2+} -felszabadulást, ezáltal hozzájárulhatnak a csökkent izomműködés kialakulásához (González Rodríguez és mtsai., 2014).

4.3 Elemi események nem fiziológiás körülmények között

4.3.1 ECRE-k szívinfarktuson átesett patkányok harántcsíkolt izmain

Vannak olyan nem vázizmokat érintő kórfolyamatok, amelyek közvetve kihatnak az izmok működésére és így megváltoztathatják annak kalciumhomeosztázisát is. Ezek közül mi először a szívinfarktus vázizomra kifejtett hatásait vizsgáltuk egy patkány modellben. Krónikus szívelégtelenségben a vázizmok olyan gyengesége alakul ki, amely nem a keringési funkciók zavarához kapcsolódik, hanem maguknak a vázizomrostoknak az elválásához. Ennek tanulmányozására baloldali koronária szűkítésen átesett patkányokat használtunk 24 héttel a beavatkozást követően (Szigeti és mtsai., 2007).

Az infarktuson átesett (PostMyocardial Infarction: PMI) állatok vázizomrostjaiban az elemi kalciumfelszabadulási események morfológiája megváltozott, az *emberek* relatív aránya megnőtt. A *spark*ok kisebb amplitúdójúak voltak és a csúcs eléréséhez szükséges idő meghosszabbodott, vagyis lassabban alakultak ki. Továbbá az egy *spark* alatt kiáramlott Ca^{2+} mennyisége lecsökkent a PMI állatokban.

Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy egy kalciumfelszabadulási esemény során megnyíló csatornák száma lecsökkent, és a RyR1 működése megváltozott, így a kalciumfelszabadulás kisebb vázizomban szívinfarktus után. Eredményeink magyarázatot adnak a károsodott vázizomműködésre a PMI állatokban (Szigeti és mtsai., 2007).

4.3.2 ECRE-k hiperkoleszterinémiás patkányok harántcsíkolt izmain

Egy másik népbetegség, a hiperkoleszterinémia és a kezelésére használt statinok vázizmokra kifejtett hatását is vizsgáltuk szintén egy állatmodellben (Vincze és mtsai., 2015). Világszerte a statinok a legelterjedtebb és leghatékonyabb gyógyszerek a koleszterinszint csökkentésére. A statin-kezelés jótékony hatásai mellett számos mellékhatással is jár, leggyakrabban a különféle izmokat érintők fordulnak elő (10%). A rabdomiolízis a statin-terápia legsúlyosabb és potenciálisan életveszélyes mellékhatása. Ezt az állapotot modellező állatkísérletben tanulmányoztuk az ECRE-k előfordulását és paramétereinek változását a hiperkoleszterinémia és a statin kezelés hatására. A vizsgálatainkat kiegészítettük a

koenzim Q₁₀ (ubiquinon, CoQ₁₀) szerepének tisztásával, mivel a statinok gátolják a CoQ₁₀ szintézisét is. Míg a hiperkoleszterolémia nem változtatta meg a *sparkok* előfordulásának gyakoriságát, a fluvastatin növelte azt mind a normokoleszterinémiás mind a hiperkoleszterinémiás patkányok vázizomrostjain. Azonban a koenzim Q₁₀ kezelés jelentősen csökkentette a spontán kalciumfelszabadulási események gyakoriságát, de nem befolyásolta amplitúdójukat és térbeli kiterjedésüket a fluvastatinnal kezelt patkányok izomrostjaiban. Viszont nem változtatta meg a *sparkok* frekvenciáját normokoleszterinémiás állatok vázizmában. Ez azt jelzi, hogy a koenzim Q₁₀ kezelés megakadályozta a *sparkok* frekvenciájának fluvastatin hatására történő növekedését anélkül, hogy jelentősebb hatása lett volna az egy esemény során felszabaduló kalcium mennyiségre. Összefoglalva, azt találtuk, hogy a fluvastatin, függetlenül a vér koleszterinszintjétől, következetesen és kifejezetten növelte a kalcium *sparkok* gyakoriságát a vázizomrostokban, amely hatás talán megelőzhető a koenzim Q₁₀ étrendbe történő hozzáadásával.

Eredményeink alátámasztják az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció szerepét a statin kezelés által kiváltott miopátiában és egy lehetséges utat mutatnak a koenzim Q₁₀ használatára a betegek vázizomtüneteinek enyhítésére (Vincze és mtsai., 2015).

4.4 Elemi események változása génmódosítás hatására vázizomban

4.4.1 A Triadin fehérje szintjének hatása az ECRE-kre tenyésztett harántcsíkolt izomsejtekben

A génmódosítás technika megjelenésekor és a genetikailag módosított állatok széleskörű elterjedése előtt sejtenyészetekben folytak a kutatások. Mi is végeztünk ilyen jellegű vizsgálatokat immortalizált vázizom eredetű sejtvonalon (C2C12) és frissen izolált vázizom sejtekből indított tenyészetben (primer sejtkultúra). Ezekben az izomsejtekben végzett kísérletekben a vizsgálatok célja a Triadin nevű fehérje szerepének tisztázása volt (Fodor és mtsai., 2008). A Triadin, az SR membránban található fehérje a vázizomban az SR terminális ciszternái junkciós membránjában helyezkedik el és a vizsgálatok alapján a RyR1-hez.

Először shRNS technikával csökkentettük a Triadin szintjét majd transzfekcióval túltermeltettük a fehérjét (overexpresszáltuk) a miotubulusokban. A kontroll miotubulusokon az ECRE-k csak elvétve voltak megtalálhatóak, bár ritkán *sparkokat* és *embereket* is megfigyelhettünk. A Triadin expressziójának csökkentése drámaian

megnövelte az ECRE-k előfordulását a miotubulusokon. Míg a *sparkok* és *emberek* amplitúdójában emelkedést találtunk, addig az események hosszában nem volt lényeges különbség.

A Triadin túltermeltetése a sejtekben az előzőekben bemutatotthoz képest ellentétes hatást gyakorolt a kalciumfelszabadulási eseményekre. A C2C12 sejtekben is találtunk *sparkokat* és *embereket* is úgy, mint a primér vázizomsejteken. Míg a fehérje túltermeltetése csökkentette a *sparkok* amplitúdóját ($0,81 \pm 0,01$ F/F₀-ról $0,59 \pm 0,01$ F/F₀-ra, $p < 0,001$), addig az események többi paraméterén nem változtatott jelentősen.

Hasonló eredményeket kaptunk Triadint overexpresszáló primér patkány miotubulusokon is. Mivel a fehérje túlzott expressziója csökkentette az SR-ból a kalciumfelszabadulást és a Triadin transzlációjának gátlása növelte a kalciumfelszabadulási események frekvenciáját és amplitúdóját, így megfigyeléseink egyértelműen alátámasztják azt az elképzelést, hogy a Triadin a RyR1 nyitásának negatív szabályozója lehet (Fodor és mtsai., 2008).

4.4.2 ECRE-k a természetes mutációval kialakult hipermuszkuláris egerek harántcsíkolt izomrostjaiban

Sejttenyészetek után egy természetes mutációval kialakuló túlzott izomtömeget mutató (hipermuszkuláris, miosztatin hiányos) egértörzzsel folytattuk az elemi események vizsgálatát (Bodnár és mtsai., 2014). A miosztatin (Mstn) széleskörűen elfogadott nézet szerint nagyon fontos negatívan szabályozó szerepet tölt be a vázizom növekedésében. Mstn hiányos egereket (Cmpt mutáció) összehasonlítva a kontroll állatokkal, jelentős izomtömeg növekedést találtak, azonban a megnövekedett izomtömeg nem jár nagyobb fizikai teljesítménnyel.

Hogy tisztázzuk a Cmpt egerekben megfigyelt gyengébb fizikai teljesítmény okát, elemi kalciumfelszabadulási eseményeket mértünk enzimatikusan izolált FDB rostokon. Habár a Cmpt vázizomrostokon is találtunk spontán elemi eseményeket a jellemző paramétereik jelentősen eltértek a kontroll állatokhoz képest.

A Cmpt rostokon mért *sparkok* átlagos amplitúdója szignifikánsan kisebb volt a kontroll rostokon mértékhez képest. Továbbá nagyobb számban találtunk rajtuk gyorsan kialakuló *sparkokat* a kontrollhoz képest, vagyis a csúcs eléréséhez szükséges idő átlagos értéke szignifikánsan csökkent. Az átlagos *sparkok* frekvenciája és FWHM-je a Cmpt mutáció hatására szignifikánsan lecsökkent.

A Cmpt izomrostokon talált kevesebb ECRE és az eseményenként felszabaduló kalcium csökkent mennyisége megmagyarázzák, hogy miért kisebbek a globális kalciumtranziensek a mutáns állatokban. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a Cmpt fenotípust kísérő változások (pl. a csökkent izomerő) részben a kalcium felszabadulási folyamatok redukált működésének a következménye. Ennek pedig a legvalószínűbb magyarázata az SR kalciumtartalmának csökkenése lehet (Bodnár és mtsai., 2014).

4.4.3 Az embrionális DHPR jelenlétének hatása az ECRE-kre egerek harántcsíkolt izomrostjaiban

Harántcsíkolt izomban a feszültségfüggő kalciumcsatornák (DHPR vagy CaV1.1) és a RyR1 fizikailag egymással összekapcsolódnak, így a CaV1.1 feszültségfüggő aktiválása közvetlenül megnyithatja a RyR1-t. A kifejlett izomban többségében jelen levő CaV1.1a variánsan keresztül folyó áram kicsi és lassan aktiválódik, így fiziológias körülmények között nem játszik szerepet a kalciumfelszabadulás elindításában. Érdekes módon emlősökben a vázizomzat érése során a depolarizáció függő kalciumbeáramlás folyamatosan csökken CaV1.1a variáns mennyiségének növekedése által. A magzati izmokban még a CaV1.1e csatornaváltozat van többségben, amelyen mérhető nagyságú kalcium áram folyik keresztül, és ez részt vesz az SR-ből történő kalciumfelszabadulás aktiválásában. A születés után az izmokban a CaV1.1e variáns szinte teljesen kicserélődik a felnőtt, rosszul vezető CaV1.1a variánsra. Megfigyelték 1-es típusú miotóniás disztrófiás (DM1) betegekben, hogy az embrionális kalciumvezető CaV1.1e variáns rendellenes expressziójának nagysága korrelál az izomgyengeségük mértékével. Lehetőségünk volt tanulmányozni a kalciumfelszabadulást harántcsíkolt izomrostokban egy genetikailag módosított egér törzsön, amelyben a CaV1.1e csatorna felnőtt izomban is jelen van (Sultana és mtsai., 2016).

Nyugalmi állapotban fiziológias extracelluláris kalciumkoncentráció jelenlétében nem alakultak ki *sparkok* sem a kontroll, sem a CaV1.1e csatornát expresszáló egerekből származó izomrostokon. Azonban ha megemeltük az extracelluláris kalciumkoncentrációt csak a CaV1.1e csatornát tartalmazó izomrostokon jelentek meg *sparkok*, melyek átlagos amplitúdója $0,140 \pm 0,001$ F/F₀ és frekvenciája $0,724 \pm 0,211$ 1/ms/mm volt. Amikor az L-típusú kalciumcsatorna blokkoló Nizoldipint használtuk, a *sparkok* eltűntek.

Ezek a megfigyelések igazolják, hogy a *sparkok* kialakulásához, vagyis a kalcium kiáramlásához az SR-ből a RyR1-en keresztül, szükséges a CaV1.1e csatornán beáramló külső kalcium. Kísérleteink azt a korábbi megfigyelést is megmagyarázzák, hogy a fejlődő izomsejtekben ahol még jelen van a CaV1.1e csatorna, miért alakulnak ki *sparkok*, míg kifejlett izomrostokon ahol már csak a CaV1.1a csatorna expresszálódik, miért nem találhatóak meg (Sultana és mtsai., 2016).

4.4.4 ECRE-k harántcsíkolt izomrostokban a miotubuláris miopátia egérmodellben

Az elektromechanikai kapcsolat tökéletlenül működik miotubuláris miopátiában, amely betegségben a PtdInsP foszfatáz miotubularint (MTM1) kódoló gén mutálódik (lásd 4.2.6 fejezet). Ezt az MTM1-hiányos egér segítségével állapították meg, amely modell jól reprodukálja az emberi miotubuláris miopátia fő jellemzőit: MTM1 hiányában az izomrostokban a triádok (az a régió, ahol egy T-tubulus két junkcionális SR terminális ciszternával néz szembe) száma lecsökken, megszakad a T-tubulus hálózat és csökken a CaV1.1 és RYR1 mennyisége is.

Ezen előzmények alapján úgy gondoltuk, hogy érdemes megvizsgálni az elemi kalciumfelszabadulási eseményeket az MTM1 hiányos izomrostokon (Kutchukian és mtsai., 2019). A kontroll preparátumokkal ellentétben, a mutáns rostokon jelentős mennyiségű *sparkot* detektáltunk nyugalmi állapotban. Míg a 43 db kontroll izomroston csak 34 db *sparkot* tudtunk regisztrálni, addig 51 db MTM1 hiányos FDB-n 1008 db elemi eseményt találtunk. A *sparkok* átlagos amplitúdója nem változott meg a mutáns izomrostokban, de a rosttal párhuzamos térbeli kiterjedésük jelentősen megnőtt.

A *sparkok* térbeli kiszélesedését megvizsgáltuk line-scan kísérletekben is. Az MTM1 hiányos rostok szokatlanul nagy amplitúdójú és térbeli szélességű masszív Ca²⁺-felszabadulási eseményeket produkáltak. Ezek az összes ECRE nagyjából 5%-át tették ki. A széles események létezése csak úgy magyarázható ha egyidőben jelentős számú RyR1 aktiválódik. Kiszámoltuk, hogy a 3,5 μm -nél nagyobb FWHM-el rendelkező események mintegy 20%-ának 5 μm -nél is nagyobb a térbeli szélessége. A széles események elemzése lehetővé tette, hogy meghatározzuk a szomszédos kalciumfelszabadulási csatornák feltehetően CICR általi aktiválódásának sebességét. Ez $228 \pm 47 \mu\text{m/s}$ -nak adódott, ami van ahhoz ($273 \pm 7 \mu\text{m/s}$), amit a békák harántcsíkolt izmain kaptunk TPEN jelenlétében (4.2.2 fejezet). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a RyR1-ek egy junkcionális egységben molekuláris kapcsolatokon keresztül

aktiválódnak, míg a szomszédos junkcionális egységek aktiválódását a CICR mechanizmus közvetíti.

Az MTM1 hiányos izomrostokon végzett kísérleteink során még egy érdekes megfigyelést tettünk. A kalciumfelszabadulási események az izomrostok kitüntetett részein fordulnak elő, mivel a térbeli eloszlásuk nem illeszkedik az egymástól független eseményeket leíró Poisson-eloszlásra (lásd 4.2.1 fejezet). Ezt azzal tudjuk magyarázni, hogy az események valószínűleg a rost sérült T-tubulussal rendelkező helyein alakulnak ki.

Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy az MTM1 gén hiányában a T-tubuláris rendszerben kialakuló változások a RyR1-k abnormális aktiválódását eredményezik, ami magyarázhatja, hogy miért csökken az SR-ből történő kalciumfelszabadulás és a mutációt hordozó egerekben valamint a betegekben az izomerő (Kutchukian és mtsai., 2019).

4.4.5 ECRE-k harántcsíkolt izomrostokban a centronukleáris miopátia egérmodelljében

Centronukleáris miopátiák az öröklött izombetegségek csoportjába tartoznak. A betegek izommintájában megtalálható a sejtmagok központi elhelyezkedése az izomrostokban. A betegség előidézésében szerepet játszó legismertebb mutációk a miotubulint (MTM1) és a dinamin 2-t (DNM2) érintik. Ennek a betegségnek is létrehozták a DNM2-t mutációt hordozó egérmodelljét, amit módunkban volt használni (Kutchukian és mtsai., 2017). A mutáns egerek reprodukálják az emberi betegség fő tüneteit: az állatokban fokozatosan izomgyengeség, majd 2 hónapos koruk után izomsorvadás alakul ki.

Az MTM1 hiányos egereken látottakhoz hasonló eredményeket kaptunk a DNM2 mutációját hordozó állatokon: nagyszámú spontán elemi kalciumfelszabadulási esemény jelent meg a nyugalomban levő FDB rostokon. Az MTM1 mutációval ellentétben ezek az események teljesen szimmetrikusak voltak térben és elenyésző számban találtunk köztük 3,5 μm -nél szélesebb *spark*okat. Viszont a *spark*ok minden jellemző paramétere szignifikánsan nagyobb volt a kontrol eseményeken találtakhoz viszonyítva. A DNM2 mutáns egerek vázizomrostjain nyugalomban talált jelentős számú ECRE és a depolarizációval kiváltott kalcium tranziensek csökkent amplitúdója is azt bizonyítja, hogy ezekben az állatokban megváltozik az ECC működése, ami magyarázhatja a genetikailag módosított egerekben és a betegekben is a gyengébb

izomműködést (Kutchukian és mtsai., 2017).

4.4.6 Az Ankirin1 fehérje szintjének hatása az ECRE-kre egér harántcsíkolt izomrosjaiban

Az SR megfelelő elhelyezkedése a miofibrillumok körül és a T-tubulusokkal való közvetlen kapcsolat (triád) elengedhetetlen az izomösszehúzódás hatékony szabályozásához. Az ankyrinek azon speciális kapcsoló fehérjék családjába tartoznak, amelyek részt vesznek membrándomének összeszervezésében. A sAnk1 hiányos egerekben kimutatták, hogy a fehérje hiánya az SR mennyiségének valamint a RyR1 és SERCA fehérjeszintjének jelentős csökkenését eredményezi. Ezek alapján feltételeztük, hogy a felsorolt változások hatással lehetnek az ECRE-k kialakulására és paramétereire a mutáns vázizomrostokban (Pierantozzi és mtsai., 2019).

Spontán kalciumfelszabadulási eseményeket mértünk fiatal (4 hónapos) és idős (10 hónapos) kontroll és sAnk1 hiányos (sAnk1-KO) egerek szaponinnal kezelt FDB izomrostjain. A képek analíziséből kiderült, hogy a *sparkok* frekvenciája csökkent a fiatal sAnk1-KO egerekben a hasonló életkorú kontroll egerekhez képest. Az ECRE-k gyakorisága csökkent a 10 hónapos kontroll egerek rostjaiban is a fiatal kontroll állatok FDB rostjaihoz képest, de a frekvencia már nem csökkent tovább az idős sAnk1-KO állatokban. A *sparkok* minden paramétere és a felszabadult kalcium mennyisége (Signal Mass) is szignifikánsan csökkent mindkét életkorban a sAnk1-KO állatok vázizomrostjaiban.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy vagy az SR-ből felszabadítható Ca^{2+} mennyisége csökken, vagy a kalciumcsatornák nyitása károsodott, vagy mindkettő jelenség egyszerre okozhatja a *sparkok* paramétereiben talált változásokat fiatal sAnk1-KO egerekben. A Ca^{2+} -homeosztázisban megfigyelt különbség kevésbé nyilvánvaló idős állatokban, mivel az életkor előre haladtával a Ca^{2+} -felszabadulás eleve csökken a vázizomrostokban. Ez arra utal, hogy a fiatal sAnk1-KO izomrostokban a kalciumháztartásban kialakult változások már nem módosulnak idővel és a vad típusú öreg egerekben találhatóéhoz hasonló szintet érnek el (Pierantozzi és mtsai., 2019).

5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

Kísérleteinkben minden esetben a spontán módon kialakuló elemi kalciumfelszabadulási eseményeket (ECRE) vizsgáltuk különböző preparátumokon és eltérő körülmények között.

1. Kidolgoztuk az egyedi vázizomrostok enzimátikus preparálásának módszerét békákból, patkányokból, egerekből és házi méhekből. Megvalósítottuk az ECRE-k optimális mérési eljárását egyedi vázizomrostokon konfokális lézerpásztázó mikroszkópon. Leírtuk az ECRE-k jellemző paramétereit mindegyik preparátumon.
2. Kifejlesztettünk két wavelet alapú automatikus ECRE felismerő programot, amelyek lehetővé teszik egyrészt vonal-menti (line-scan), másrészt kétdimenziós (XY) pásztázással készült konfokális mikroszkópos felvételeken nagyszámú esemény automatikus detektálását és elemzését.
3. Megmutattuk, hogy békák harántcsíkolt izomrostjaiban a kisfokú depolarizáció és a koffeinnel való kezelés különböző hatásmechanizmussal, de emeli a *sparkok* frekvenciáját és amplitúdóját. Egészséges izomrostban a *sparkok* egyenletesen oszlanak el, nincsenek kitüntetett helyek az elemi kalciumfelszabadulási események szempontjából. A tovaterjedő események $273 \pm 7 \mu\text{m/s}$ átlagos terjedési sebességgel mozognak.
4. Emlősök vázizomrostjain bebizonyítottuk, hogy egyetlen rianodin csatorna megnyílása *embert* eredményez, nem pedig *sparkot*. A különböző típusú események alatt felszabadult kalcium mennyiségéből megbecsültük, hogy kb. 30 RyR csatorna egyidejű megnyílása hoz létre egy átlagos *sparkot*. A különböző amplitúdójú *sparkok* illetve lépcsős *emberek* megjelenésével bebizonyítottuk, hogy a RyR1-nek szubkonduktancia állapotai vannak.
5. A humán miopátiák egérmodelljeiben megállapítottuk, hogy az MTM1 gén hiányában a T-tubuláris rendszerben kialakuló változások a RyR1-k abnormális aktiválódását eredményezik, ami megmagyarázza az SR-ből történő kalciumfelszabadulás csökkenését és a betegekben az izomerő hanyatlását. A sérült belső struktúrájú izomrostokon a *sparkok* kialakulásának helyei nem egyenletesen oszlanak meg, a T-tubulusok hiányában a RyR1

könnyebben megnyílnak. A DNM2 gén mutációja pedig jelentős számú ECRE kialakulását eredményezi a nyugalomban levő vázizomrostokon, ami szintén megmagyarázhatja a betegekben a csökkent vázizomműködést. A humán betegségre jellemző PtdInsP-k kóros felhalmozódásáról megmutattuk, hogy csökkenti a rianodin receptoron keresztüli Ca^{2+} -felszabadulást.

6. A vázizmokat közvetlenül nem érintő két kórfolyamatot vizsgálva kimutattuk, hogy az infarktuson átesett patkányok vázizomrostjain az *emberek* relatív aránya megnőtt, a *sparkok* amplitúdójuk kisebb lett, lassabban alakultak ki és az egy *spark* alatt kiáramlott Ca^{2+} mennyisége lecsökkent. Ez megmagyarázhatja a károsodott vázizomműködést szívinfarktus után. Bebizonyítottuk, hogy amíg a hiperkoleszterinémia patkányokban nem változtatja meg a *sparkok* frekvenciáját, addig a fluvastatin függetlenül a vér koleszterinszintjétől, növeli a *sparkok* gyakoriságát a vázizomrostokban, így okozva izomgyengeséget, amely hatás megelőzhető a koenzim Q₁₀ étrendbe történő alkalmazásával.
7. A vázizmokat érintő genetikai mutációk vizsgálata során egerek vázizmaiban azt találtuk, hogy a miosztatin gén károsodása után csökken az ECRE-k száma és kisebb az eseményenként felszabaduló kalcium mennyisége. Megmutattuk, hogy magas extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció jelenlétében az embrionális CaV1.1e kalciumcsatornát tartalmazó vázizomrostokon nyugalomban *sparkok* alakulnak ki. Az SR normális elhelyezkedését biztosító Ankirin1 fehérje hiányában pedig kevesebb és kisebb amplitúdójú *sparkot* találtunk. Vagyis minden vizsgált mutáció az SR-ből felszabadítható Ca^{2+} mennyiségét csökkenti vagy a kalciumcsatornák nyitását akadályozza, ami gyengült izomműködéséhez vezet.

6. A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK

(Az MTMT nyilvános keresői felülete alapján)

Közlemények száma: 17 (ebből D1: 8, Q1: 7; Q2: 2) Független hivatkozások száma: 149

Utolsó szerzős közlemények száma: 4 (ebből D1: 2, Q1: 1; Q2: 1) Független hivatkozások száma: 23

Első/egyetlen szerzős közlemények száma: 4 (ebből D1: 2, Q1: 2) Független hivatkozások száma: 47

Társszerzős közlemények száma: 9 (ebből D1: 4; Q1: 4; Q2: 1) Független hivatkozások száma: 79

A lista az első szerző neve szerinti ABC sorrendben készült.

Almassy, J., Sztretye, M., Lukacs, B., Dienes, B., Szabo, L., Szentesi, P., Vassort, G., Csernoch, L., & Jona, I. (2008). Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 457(1), 171–183. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0504-7>. Független idéző: 5 Függő idéző: 4 Összesen: 9

Bodnár, D., Geyer, N., Ruzsnavszky, O., Oláh, T., Hegyi, B., Sztretye, M., Fodor, J., Dienes, B., Balogh, Á., Papp, Z., Szabó, L., Müller, G., Csernoch, L., & Szentesi, P. (2014). Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signalling. *Journal of Physiology*, 592(6), 1353–1365. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261958>. Független idéző: 14 Függő idéző: 11 Összesen: 25

Collet, C., Charreton, M., Szabo, L., Takacs, M., Csernoch, L., & Szentesi, P. (2021). Elementary calcium release events in the skeletal muscle cells of the honey bee *Apis mellifera*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96028-w>. Független idéző: 1 Összesen: 1

Cserne Szappanos, H., Vincze, J., Bodnár, D., Dienes, B., Schneider, M. F., Csernoch, L., & Szentesi, P. (2020). High Time Resolution Analysis of Voltage-Dependent and Voltage-Independent Calcium Sparks in Frog Skeletal Muscle Fibers. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.599822>. Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3

Fodor, J., Gönczi, M., Sztretye, M., Dienes, B., Oláh, T., Szabó, L., Csoma, E., Szentesi, P., Szigeti, G. P., Marty, I., & Csernoch, L. (2008). Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} signals in skeletal muscle cells in culture. *Journal of Physiology*, 586(23), 5803–5818. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160457>. Független idéző: 11 Függő idéző: 14 Összesen: 25

- González Rodríguez, E., Lefebvre, R., Bodnár, D., Legrand, C., Szentesi, P., Vincze, J., Poulard, K., Bertrand-Michel, J., Csernoch, L., Buj-Bello, A., & Jacquemond, V. (2014). Phosphoinositide substrates of myotubularin affect voltage-activated Ca^{2+} release in skeletal muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 466(5), 973–985. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1346-5>. Független idéző: 3 Fügő idéző: 10 Összesen: 13
- Kutchukian, C., Szentesi, P., Allard, B., Buj-Bello, A., Csernoch, L., & Jacquemond, V. (2019). Ca^{2+} -induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in myotubularin-deficient muscle fibers. *Cell Calcium*, 80, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.04.004>. Független idéző: 4 Fügő idéző: 3 Összesen: 7
- Kutchukian, C., Szentesi, P., Allard, B., Trochet, D., Beuvin, M., Berthier, C., Tourneur, Y., Guicheney, P., Csernoch, L., Bitoun, M., & Jacquemond, V. (2017). Impaired excitation–contraction coupling in muscle fibres from the dynamin2R465W mouse model of centronuclear myopathy. *Journal of Physiology*, 595(24), 7369–7382. <https://doi.org/10.1113/JP274990>. Független idéző: 8 Fügő idéző: 12 Összesen: 20
- Lukács, B., Sztretye, M., Almássy, J., Sárközi, S., Dienes, B., Mabrouk, K., Simut, C., Szabó, L., Szentesi, P., De Waard, M., Ronjat, M., Jóna, I., & Csernoch, L. (2008). Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophysical Journal*, 95(7), 3497–3509. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120840>. Független idéző: 11 Fügő idéző: 13 Összesen: 24
- Pierantozzi, E., Szentesi, P., Al-Gaadi, D., Oláh, T., Dienes, B., Sztretye, M., Rossi, D., Sorrentino, V., & Csernoch, L. (2019). Calcium homeostasis is modified in skeletal muscle fibers of small ankyrin1 knockout mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133361>. Független idéző: 3 Fügő idéző: 4 Összesen: 7
- Sultana, N., Dienes, B., Benedetti, A., Tuluc, P., Szentesi, P., Sztretye, M., Rainer, J., Hess, M. W., Schwarzer, C., Obermair, G. J., Csernoch, L., & Flucher, B. E. (2016). Restricting calcium currents is required for correct fiber type specification in skeletal muscle. *Development (Cambridge)*, 143(9), 1547–1559. <https://doi.org/10.1242/dev.129676>. Független idéző: 32 Fügő idéző: 10 Összesen: 42
- Szabó, L. Z., Vincze, J., Csernoch, L., & Szentesi, P. (2010). Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms. *Journal of Theoretical Biology*, 264(4), 1279–1292. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.04.005>. Független idéző: 6 Fügő idéző: 11 Összesen: 17
- Szentesi, P., Jacquemond, V., Kovács, L., & Csernoch, L. (1997). Intramembrane charge movement and sarcoplasmic calcium release in enzymatically isolated mammalian skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, 505(2), 371–384.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.371bb.x>. Független idéző: 23 Függő idéző: 30 Összesen: 53

Szentesi, P., Szappanos, H., Szegedi, C., Gönczi, M., Jona, I., Cseri, J., Kovács, L., & Csernoch, L. (2004). Altered Elementary Calcium Release Events and Enhanced Calcium Release by Thymol in Rat Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*, 86, 1436–1253. Független idéző: 15 Függő idéző: 14 Összesen: 29

Szigeti, G. P., Almássy, J., Sztretye, M., Dienes, B., Szabó, L., Szentesi, P., Vassort, G., Sárközi, S., Csernoch, L., & Jóna, I. (2007). Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 455(3), 541–553. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0298-z>. Független idéző: 4 Függő idéző: 5 Összesen: 9

Sztretye, M., Almássy, J., Deli, T., Szentesi, P., Jung, C., Dienes, B., Simut, C. A., Niggli, E., Jona, I., & Csernoch, L. (2009). Altered sarcoplasmic reticulum calcium transport in the presence of the heavy metal chelator TPEN. *Cell Calcium*, 46(5–6), 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.10.002>. Független idéző: 5 Függő idéző: 2 Összesen: 7

Vincze, J., Jenes, Á., Füzi, M., Almássy, J., Németh, R., Szigeti, G., Dienes, B., Gaál, Z., Szentesi, P., Jóna, I., Kertai, P., Paragh, G., & Csernoch, L. (2015). Effects of fluvastatin and coenzyme Q10 on skeletal muscle in normo- and hypercholesterolaemic rats. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 36(3), 263–274. <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9413-5>. Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3