

# Uloga kalcija u prijenosu signala

---

Stipanović, Narda

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:637055>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO –TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ULOGA KALCIJA U PRIJENOSU SIGNALA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Narda Stipanović**

**Matični broj: 327**

**Split, rujan 2018.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ULOGA KALCIJA U PRIJENOSU SIGNALA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Narda Stipanović**

**Matični broj: 327**

**Split, rujan 2018.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**ROLE OF CALCIUM IN SIGNAL TRANSDUCTION**

**BACHELOR THESIS**

**Narda Stipanović**

**Parent number: 327**

**Split, rujan 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet  
Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Nastavni predmet:** Biokemija

**Tema rada:** je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

**Mentor:** doc. dr. sc. Mila Radan

**Pomoć pri izradi:**

### *ULOGA KALCIJA U PRIJENOSU SIGNALA*

Narda Stipanović, 327

#### **Sažetak**

Ljudski organizam je izgrađen od velikog broja minerala, a jedan od najzastupljenijih je kalcij. Većina tog minerala se nalazi u kostima gdje ima funkciju održavanja gustoće i čvrstoće. Kalcij se ne može proizvesti u tijelu pa ga moramo uzimati hranom. Za njegovu apsorpciju osobito je važan vitamin D. Pronađeno je da  $\text{Ca}^{2+}$  nije raspoređen u cijeloj stanici, a tehnologija protočne citometrije nudi brojne prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike za mjerenje unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$ . Poremećaj normalnog signala  $\text{Ca}^{2+}$  doprinosi razvoju malignih fenotipova.

Unutarstanični protein, kalmodulin, posrednik je u mnogim djelovanjima kalcija jer mu omogućava gibanje iz jednog dijela stanice u drugi. Koncentracijom kalcijevih iona regulirana je propusnost pukotinskih spojeva.

Promjena unutarstanične homeostaze  $\text{Ca}^{2+}$  može inicirati nastanak tumora. Stanice raka koriste iste kanale kalcija i pumpe kao i nemaligne stanice. Prijelaz  $\text{Ca}^{2+}$  preko plazmatske membrane u stanicu, ključni je okidač ili regulator staničnih procesa za napredovanje tumora. Tumor označava skup izmijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast tkiva. Proces tijekom kojeg se normalne stanice pretvore u tumorske stanice se naziva neoplastičnom pretvorbom. Zloćudni tumor koji može biti opasan za život naziva se rakom (cancer).

**Ključne riječi:** kalcij, prijenos signala, rak

**Rad sadrži:** 23 stranica, 14 slika, 11 literalnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Doc. dr. sc. Mila Radan - član-mentor

**Datum obrane:** 27.09.2018.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Rudera Boškovića 35**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate Chemistry

**Scientific area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Course title:** Biochemistry

**Thesis subject:** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

**Mentor:** doc. dr. sc. Mila Radan

**Tehnickal assistance:**

### *ROLE OF CALCIUM IN SIGNAL TRANSDUCTION*

Narda Stipanović, 327

#### **Abstract:**

The human body is made of a large number of minerals, and one of the most commonly present is calcium. Most of this mineral is in bones where it has the function of maintaining the density and strength. Calcium cannot be produced in the body so we have to take it with food. Vitamin D is particularly important for its absorption.  $\text{Ca}^{2+}$  was not found throughout the cell and the flow cytometry technology offers many advantages over traditional techniques for measuring intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level. The disorder of normal  $\text{Ca}^{2+}$  signal contributes to the development of malignant phenotypes. Physiologically, calcium can be divided into either intracellular or extracellular.

Calcium-binding intracellular protein, calmodulin, is an intermediary molecule in many calcium activities because it allows its movement from one part of the cell to another.

Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis changes in the cancer cell and change is also involved in tumor initiation. Cancer cells use the same calcium channels and pumps as non-malignant cells. Transition of  $\text{Ca}^{2+}$  through the plasma membrane is a key trigger or cellular processes in tumor progression. Tumor represents a set of changed cells that show an irregular and progressive tissue growth. The process of transforming normal cells into tumor cells is called a neoplastic transformation. A malignant tumor that can be life-threatening is called cancer.

**Keywords:** calcium, signal transduction, cancer

**Thesis contains:** 23 pages, 14 figures, 11 references

**Original in:** Croatian

**Defence Committee:**

1. Olivera Politeo –PhD. Associate prof. - chairperson
2. Franko Burčul – PhD. Assistant prof.- member
3. Mila Radan – PhD. Assistant prof.- supervisor

**Defence date:** 27.09.2018.

**Printed and electronic (pdf version) of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.





*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od travnja do srpnja 2018. godine.*

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Mili Radan koja mi je svojim prenesenim znanjem pomogla u izradi ovog završnog rada.*

*Od srca zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i prijateljima na pruženoj potpori i vjeri u mene tijekom studiranja.*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

- Proučiti ulogu kalcija u ljudskom organizmu.
- Proučiti ulogu kalcija kao sekundarnog prenositelja signala.
- Proučiti kako koncentracija kalcija utječe na organizam.

## SAŽETAK

Ljudski organizam izgrađen je od velikog broja minerala, a jedan od najzastupljenijih je kalcij. Većina tog minerala nalazi se u kostima gdje ima funkciju održavanja gustoće i čvrstoće. Kalcij se ne može proizvesti u tijelu pa ga moramo uzimati hranom. Za njegovu apsorpciju osobito je važan vitamin D. Pronađeno je da  $\text{Ca}^{2+}$  nije raspoređen u cijeloj stanici, a tehnologija protočne citometrije nudi brojne prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike za mjerenje unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$ . Poremećaj normalnog signala  $\text{Ca}^{2+}$  doprinosi razvoju malignih fenotipova.

Unutarstanični protein, kalmodulin, posrednik je u mnogim djelovanjima kalcija jer mu omogućava gibanje iz jednog dijela stanice u drugi. Koncentracijom kalcijevih iona regulirana je propusnost pukotinskih spojeva.

Promjena unutarstanične homeostaze  $\text{Ca}^{2+}$  može inicirati nastanak tumora. Stanice raka koriste iste kanale kalcija i pumpe kao i nemaligne stanice. Prijelaz  $\text{Ca}^{2+}$  preko plazmatske membrane u stanicu, ključni je okidač ili regulator staničnih procesa za napredovanje tumora. Tumor označava skup izmijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast tkiva. Proces tijekom kojeg se normalne stanice pretvore u tumorske stanice se naziva neoplastičnom pretvorbom. Zloćudni tumor koji može biti opasan po život naziva se rakom.

**ključne riječi:** kalcij, prijenos signala, rak

## SUMMARY

The human body is made of a large number of minerals, and one of the most commonly present is calcium. Most of this mineral is in bones where it has the function of maintaining the density and strength. Calcium cannot be produced in the body so we have to take it with food. Vitamin D is particularly important for its absorption.  $\text{Ca}^{2+}$  was not found throughout the cell and the flow cytometry technology offers many advantages over traditional techniques for measuring intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level. The disorder of normal  $\text{Ca}^{2+}$  signal contributes to the development of malignant phenotypes. Physiologically, calcium can be divided into either intracellular or extracellular.

Calcium-binding intracellular protein, calmodulin, is an intermediary molecule in many calcium activities because it allows its movement from one part of the cell to another.

Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis changes in the cancer cell and change is also involved in tumor initiation. Cancer cells use the same calcium channels and pumps as non-malignant cells. Transition of  $\text{Ca}^{2+}$  through the plasma membrane is a key trigger or cellular processes in tumor progression. Tumor represents a set of changed cells that show an irregular and progressive tissue growth. The process of transforming normal cells into tumor cells is called a neoplastic transformation. A malignant tumor that can be life-threatening is called cancer.

**keywords:** calcium, signal transduction, cancer

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1 OPĆI DIO .....	2
1.1 KALCIJ (Ca) .....	2
1.2 METABOLIZAM KALCIJA.....	3
1.2.1 PRIJENOS KALCIJA KROZ STANIČNU MEMBRANU .....	3
1.2.2 SKLADIŠTENJE.....	9
1.2.3 APSORPCIJA KALCIJA .....	9
1.3 FUNKCIJE KALCIJA U ORGANIZMU .....	9
1.3.1 STANIČNA SIGNALIZACIJA.....	10
1.4 KALCIJ U STANICAMA RAKA.....	12
2. TUMORI .....	14
2.1 POJEDINE TUMORSKE KLASIFIKACIJE .....	15
2.1.1 KLASIČNA KLASIFIKACIJA.....	15
2.1.2 HISTOGENSKA KLASIFIKACIJA TUMORA.....	15
2.1.3 BIOLOGIJA TUMORSKOG RASTA .....	16
3. METODA MJERENJA KONCENTRACIJE KALCIJA.....	17
3.1 RAZINE KALCIJA.....	17
3.1.1 NISKE RAZINE KALCIJA .....	17
3.1.2 VISOKE RAZINE KALCIJA.....	17
3.2 CITOMETRIJA.....	18
3.3 DRUGE METODE VEZANE ZA CITOMETRIJU .....	18
4. FLUOROCENTNI INDIKATORI.....	19
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. LITERATURA .....	23

## 1. UVOD

Ljudski organizam izgrađen je od brojnih minerala, a jedan od najzastupljenijih je kalcij. Većina kalcija nalazi se u kostima gdje održava gustoću i čvrstoću istih. Kalcij se ne može proizvesti u tijelu pa ga moramo uzimati hranom. Ovaj mineral sudjeluje u mnogim vitalnim funkcijama i igra važnu ulogu u putovima prijenosa signala. Kalcij može djelovati u prijenosu signala koji proizlazi iz aktivacije ionskih kanala ili kao drugi glasnik izazvan neizravnim putevima prijenosa signala. Prva pouzdana mjerenja  $\text{Ca}^{2+}$  iona izvršena su injektiranjem fotoproteina (aquorin) u divovsko, prstenasto mišićno vlakno. Pronađeno je da  $\text{Ca}^{2+}$  nije raspoređen u cijeloj stanici te da se unutarstanična heterogenost  $\text{Ca}^{2+}$  promatra u različitim stanicama. S vremenom, tehnologija je uznapredovala pa danas protočna citometrija nudi brojne prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike za mjerenje unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$ . Preispituje se promjena unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  sa drugim parametrima stanice, uključivši analizu staničnog ciklusa, promjene u integritetu stanične membrane i indukciju markera apoptoze. Poremećaj normalnog signala  $\text{Ca}^{2+}$  doprinosi razvoju malignih fenotipova.

## 1.1 KALCIJ (Ca)

Kalcij je kemijski element smješten u skupinu zemno-alkalijskih metala. Kemijski simbol u periodnom sustavu elemenata mu je Ca. U prirodi je jedan od najrasprostranjenijih elemenata, mekan, sjajan bijelo-srebrni metal koji polako reagira sa vodenom parom, kisikom i dušikom iz zraka. Gorenjem na zraku daje blještavu narančasto-crvenu svjetlost. Kalcijeve soli su često dobro topljive u vodi, no uključene su i iznimke poput hidroksida, sulfata, fosfata i karbonata. <sup>1</sup>

U ljudskom tijelu prema zastupljenosti nalazi se na petom mjestu. Kalcij postoji u 3 fiziokemijska stanja u plazmi: oko 50% je slobodno (ionizirano), 10% je u obliku kompleksa sa malim difuzibilnim organskim i anorganskim anionima, a 40% je vezano za proteine plazme. Biološki aktivni oblik je frakcija slobodnog kalcija. Njegova koncentracija u plazmi je regulirana sa kalcij regulirajućim hormonom 1,25 – dihidroksi-vitaminom D<sub>3</sub> i paratireoidnim hormonom (PTH). Uobičajan način vezanja kalcija je njegova koordinacija sa šest atoma kisika iz proteina i jednim kisikom iz vode. (Slika 1.) Kalcij se veže sa proteinima na negativno nabijena mjesta iz čega vidimo da je vezanje ovisno o pH. Fiziološki, kalcij se može podijeliti na unutarstanični ili izvanstanični. Unutarstanični kalcij ima važnu ulogu u kontrakciji mišića, metabolizmu glikogena i diobi stanica dok izvanstanični kalcij osigurava ione kalcija za mineralizaciju kostiju, koagulaciju krvi, održavanje razine unutarstaničnog kalcija i potencijala plazmatske membrane.

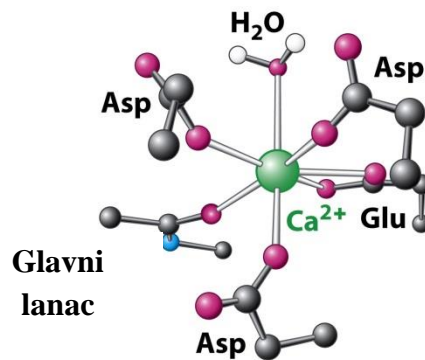


Figure 14-13  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

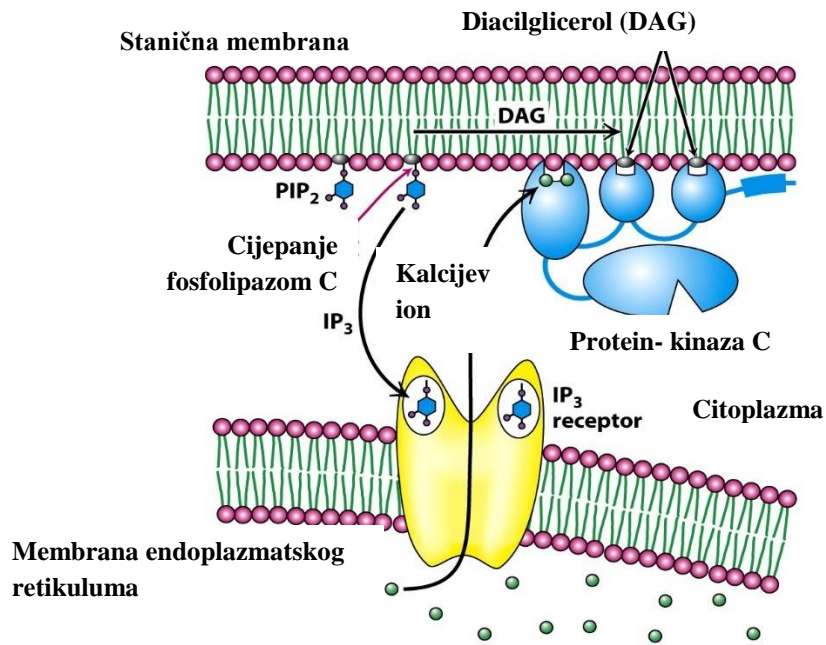
Slika 1. Vezno mjesto kalcija <sup>4</sup>



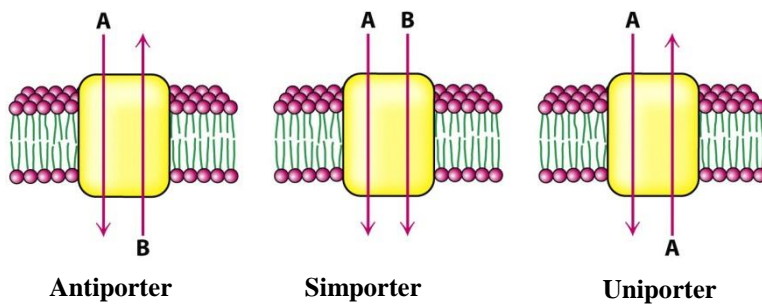
## 1.2 METABOLIZAM KALCIJA

### 1.2.1 PRIJENOS KALCIJA KROZ STANIČNU MEMBRANU

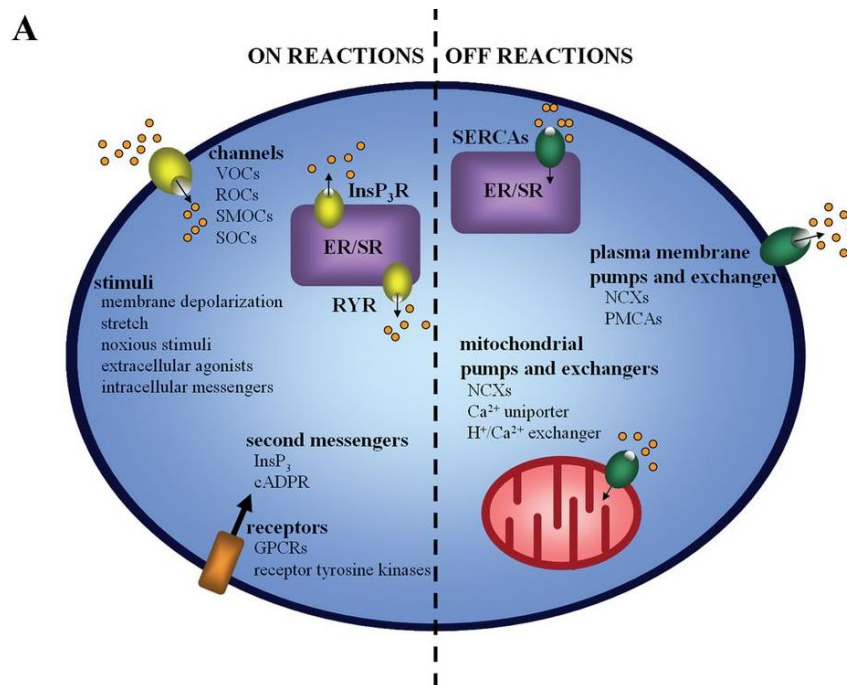
Stanična membrana je izgrađena od lipidnog dvosloja. Lipidni dvosloji su obično fosfolipidi koji imaju hidrofilnu glavu i dva hidrofobna repa. Molekule su orijentirane tako da su hidrofilne fosfatne glave usmjerene prema vodi na obje strane dvosloja, a hidrofobni repovi u unutrašnjosti dvosloja. Putem difuzije ili aktivnim transportom vrši se prijenos lipidnim dvoslojem. Brzina samog transporta ovisi o topljivosti tvari koja se prenosi. Za prijenos iona kalcija koriste se bjelančevinasti kanali i energija u obliku ATP-a. Koncentracija kalcija u citosolu 10000 puta je manja od one u izvanstaničnoj tekućini. Kalcijske crpke održavaju staničnu koncentraciju kalcija u konstantnoj ravnoteži. Jedna kalcijeva crpka ubacuje kalcijeve ione u mitohondrije ili sarkoplazmatski retikulum (SR), a druga kalcijeva crpka se nalazi na staničnoj membrani i izbacuje kalcij iz stanice. Osim kalcijevom crpkom, kalcijevi ioni se prenose i putem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiportera koji transportira ione kalcija iz stanice, a u stanicu ione natrija. Unutarstanične razine  $\text{Ca}^{2+}$  se moraju održavati niskim kako bi se spriječilo taloženje karboksiliranih i fosforiliranih spojeva koji sa  $\text{Ca}^{2+}$  stvaraju slabo topljive soli. <sup>2</sup>



Slika 2. Prijenos kalcija<sup>4</sup>

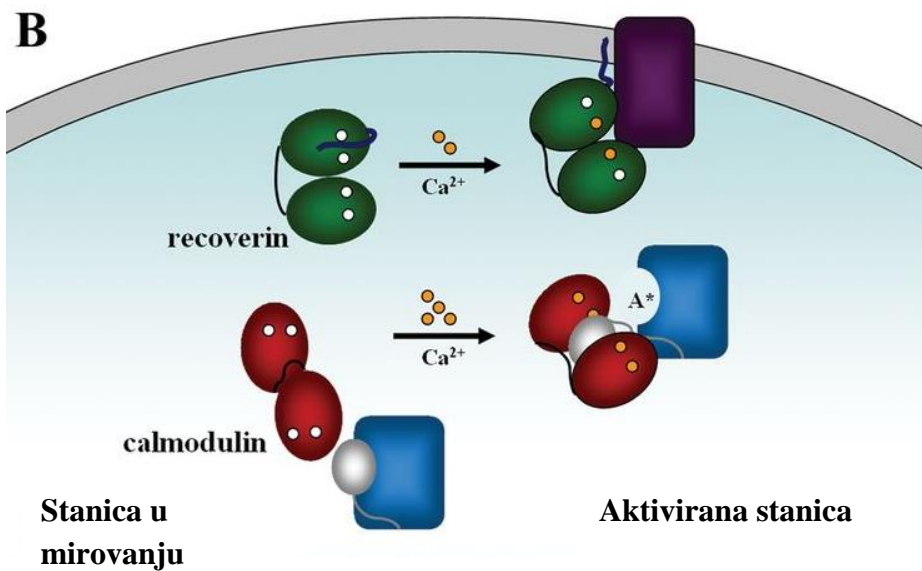


Slika 3. Vrste transportera<sup>4</sup>



**Slika 4.** Uloga kalcija u staničnoj signalizaciji <sup>11</sup>

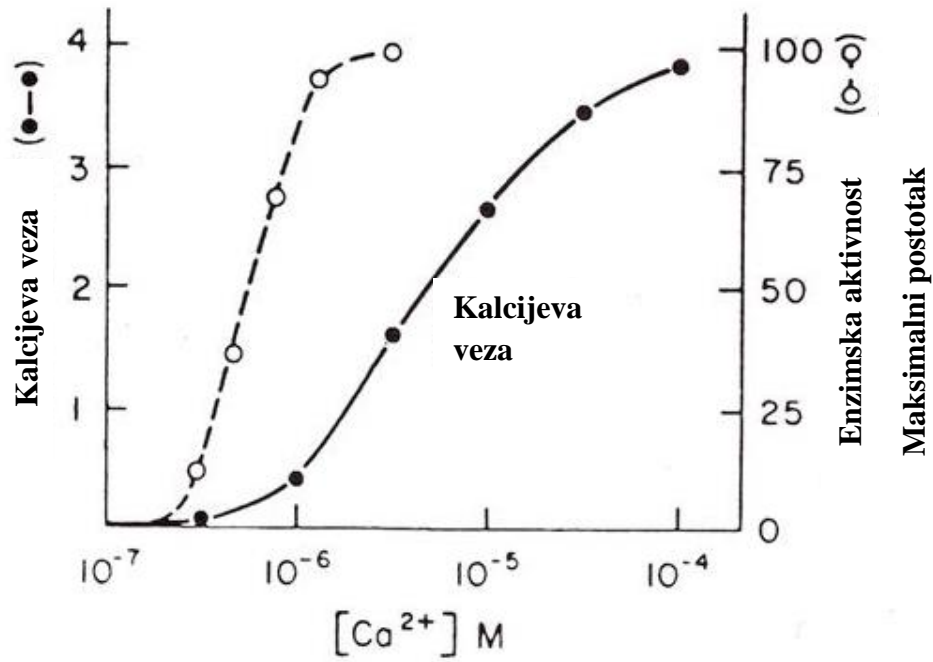
Povećanje unutarstanične koncentracije Ca<sup>2+</sup> je uzrokovano reakcijama koje su potaknute različitim podražajima. Povećanje se odvija zbog oslobađanja iz unutarstaničnih područja kao što su endoplazmatski retikulum / sarkoplazamtski retikulum (ER / SR), preko kanala kao što su inozitol (Ins 1,4,5) P3 ili rianodinski receptor (InsP3R i RYR) ili pak ulazom vanjskog Ca<sup>2+</sup> kroz različite kanale. Proces uključuje naponske operatore hlapljive organske spojeve (VOC), receptore (ROC), druge operatorne glasnice; supramolekularni organizacijski centri (SMOCs) i skladišni kanal (SOCs). Otpuštanje Ca<sup>2+</sup> iz ER / SR pokreću drugi glasnici, uključujući Ins (1,4,5) P3 (InsP3) i cikličku ADP-ribozu (cADPR). Oni su rezultat signalnih kaskada koje iniciraju receptori koji se nalaze u plazmi. Neki od takvih receptora su G-protein-vezani receptori (GPCRs) i receptorske tirozinske kinaze. Tijekom "isključnih reakcija", Ca<sup>2+</sup> je uklonjen iz citoplazme jer se ponovno izdvaja u ER / SR putem enzima SERCA koji je pohranjen u mitohondrijima Ca<sup>2+</sup> uniporterom ili preko NCXs (Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup>) i H<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup>. Ca<sup>2+</sup> može biti istisnut iz stanice i preko NCX i plazma membranske Ca<sup>2+</sup> ATPaze (PMCA).



**Slika 5.** Konformacijska promjena nakon senzorskog vezanja kalcija <sup>11</sup>

Konformacijska promjena koja nastaje kada senzori vežu  $\text{Ca}^{2+}$  omogućava da ti proteini budu u interakciji sa svojim proteinskim ciljevima. U slučaju kalmodulin (CaM),  $\text{Ca}^{2+}$  vezani oblik veže se na autoinhibičnu domenu (siva boja) svog ciljnog enzima (plava), što rezultira izlaganjem aktivnog mjesta ( $\text{A}^*$ ). Za oporavak,  $\text{Ca}^{2+}$  vezanje rezultira istiskivanjem mijelonilne skupine. Ovaj protein je ciljni protein (ljubičasto) i prikazuje se na plazmatskoj membrani.

C



**Slika 6.** Usporedba krivulje  $Ca^{2+}$  veze sa CaM (●) i krivulje aktivacije enzima njegove ciljne cikličke nukleotidne fosfodiesteraze (○).<sup>11</sup>

Ovisnost o enzimskoj aktivnosti na  $Ca^{2+}$  vezanom stanju CaM je prikazano u grafu. Također je uočljiva i razina  $Ca^{2+}$  koja je potrebna za aktivaciju enzima koja je posljedica pozitivne kooperativnosti kroz koju CaM veže  $Ca^{2+}$ .

### 1.2.1.1 MEHANIZAM PUMPANJA $\text{Ca}^{2+}$ POMOĆU ENZIMA SERCA

1. Ciklus započinje s enzimom u nefosforiliziranom stanju, sa dva kalcijeva iona. Cjelokupnu konformaciju enzima u tom stanju nazvat ćemo  $E_1$ . U konformaciji sa vezanim ionom  $\text{Ca}^{2+}$  koju ćemo nazivati  $E_1-(\text{Ca}^{2+})_2$ , sarkoplazmatska /endoplazmatska retikulum kalcij ATPaza (SERCA) može izmjenjivati kalcijeve ione samo sa kalcijevim ionima sa citoplazmatske strane membrane.
2. U konformaciji  $E_1$  enzim može vezati ATP. Domene N, P, i A se preslaguju i zatvaraju se oko vezanog ATP-a. Kalcijevi ioni su zarobljeni unutar enzima.
3. Fosforilna skupina se zatim prenosi sa molekule ATP na Asp 351.
4. Otpuštanjem molekule ADP, mijenja se konformacija enzima, ali i membranska domena. Takva konformacija se naziva  $E_2$  ili ako je u fosforiliranom obliku  $E_2-P$ . U konformaciji  $E_2-P$  vezno se mjesto za  $\text{Ca}^{2+}$  razara i kalcijevi ioni se otpuštaju na suprotnu stranu membrane od one na koju su ušli. Konformacijski prijelaz iz  $E_1$  u  $E_2$  se naziva izokretanjem.
5. Fosforilaspartatni ostatak se hidrolizira, a fosfat otpušta.
6. Otpuštanjem fosfata nestaju interakcije koje su činile konformaciju  $E_2$  stabiliziranom i enzim se vraća u stanje  $E_1$ .<sup>4</sup>

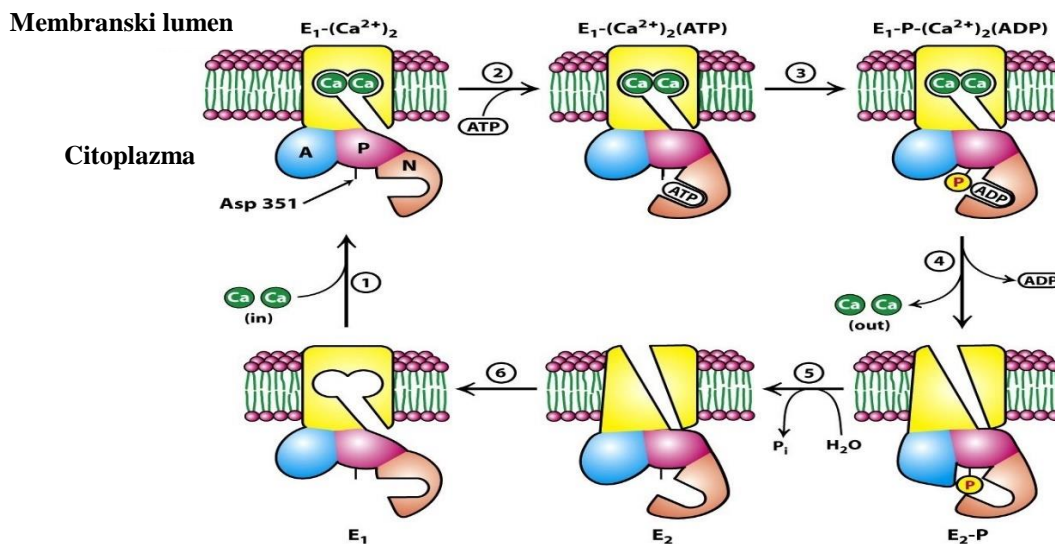


Figure 13-5  
Biochemistry, Sixth Edition

Slika 7. Pumpanje kalcija<sup>4</sup>

## **1.2.2 SKLADIŠTENJE**

Sarkoplazmatski retikulum je unutarstanični prostor za pohranjivanje  $\text{Ca}^{2+}$ . Tijekom mirovanja kalcijevi ioni su aktivnim transportom uvučeni u SR. Prilikom mirovanja, crpka s pogonom na ATP smanjuje koncentraciju kalcijevih iona u citoplazmi i povećava razinu unutar SR.

## **1.2.3 APSORPCIJA KALCIJA**

Divalentni kationi se slabo apsorbiraju kroz crijevnu sluznicu. Oko sedam osmina dnevno unesenog kalcija se ne apsorbira, već se izlučuje izmetom dok preostala osmina se izlučuje mokraćom. Važnu ulogu u povećanju apsorpcije kalcija iz probavnog sustava ima vitamin D. Aktivni proizvod vitamina D je 1,25 – dihidroksikolekalciferol koji nastaje u bubrezima. 1,25-dihidroksikolekalciferol djeluje na pospješene apsorpcije kalcija poticanjem stvaranja proteina koji veže kalcij u epitelnim crijevnim stanicama. Mehanizmom negativne povratne sprege kontrolira se koncentracija 1,25 – dihidroksikolekalciferola i  $\text{Ca}^{2+}$  u plazmi. Porastom koncentracije kalcijevih iona, smanjuje se razina 1,25-dihidroksikolekalciferola, a time se smanjuje i apsorpcija kalcija iz probavnog sustava. Hormon kalcitonin luči štitna žlijezda, a ima funkciju smanjenja koncentracije iona kalcija u krvi. <sup>2</sup>

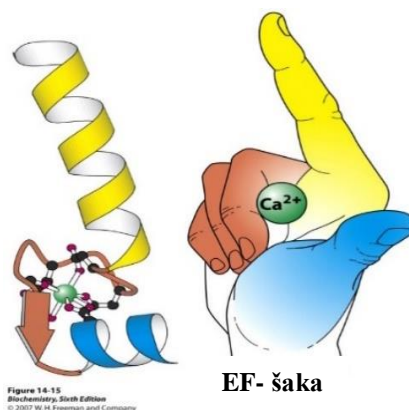
## **1.3 FUNKCIJE KALCIJA U ORGANIZMU**

Većina kalcija se nalazi u kostima i zubima. Osim što kalcij služi kao gradivni element kostura, važan je za rad živčanog i mišićnog sustava, regulira krvni tlak i zgrušavanje krvi te srčani ritam.

### 1.3.1 STANIČNA SIGNALIZACIJA

Unutarstanični protein koji veže kalcij, kalmodulin, posrednik je u mnogim djelovanjima kalcija jer mu omogućava gibanje iz jednog dijela stanice u drugi. Kalmodulin pripada porodici proteina konfiguracije EF-šake koja se sastoji od uzvojnice, petlje te druge uzvojnice. Kalmodulin sadrži četiri vezna mjesta za kalcij. (Slika7.) Aktivacija kalmodulina dolazi nakon što se koncentracija kalcija poveća na približno  $0,5\mu\text{M}$ . Kompleks kalcija/ kalmodulina zatim se veže na različite ciljne proteine, uključujući protein-kinaze. CaM-kinaze se aktiviraju pomoću kalcij/kalmodulin kompleksa, a one fosforiliraju metaboličke enzime, ionske kanale i transkripcijske faktore. (Slika8.)<sup>3,7</sup>

Kalcij također ima utjecaj na pukotinski spoj (engl. *gap junction*). Pukotinski spoj je vodeni kanal kod eukariota još poznat i kao kanal stanica-stanica. Takav naziv ima jer služi kao put za prolaz između unutrašnjosti stanica koje se dodiruju. Koncentracijom kalcijevih iona regulirana je propusnost pukotinskih spojeva. Postupno zatvaranje tih spojeva je uzrokovano porastom unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  iona. Pukotinski spoj se sastoji od dviju nasuprotnih cilindričnih jedinica zvanih koneksoni, a konekson se sastoji od šest podjedinica. Konformacijske promjene kao što su klizanja i zakretanja vrše također kalcijevi ioni, a rezultat je otvaranje i zatvaranje pukotinskih spojeva.<sup>4,6</sup>



Slika 8. EF-šaka<sup>4</sup>



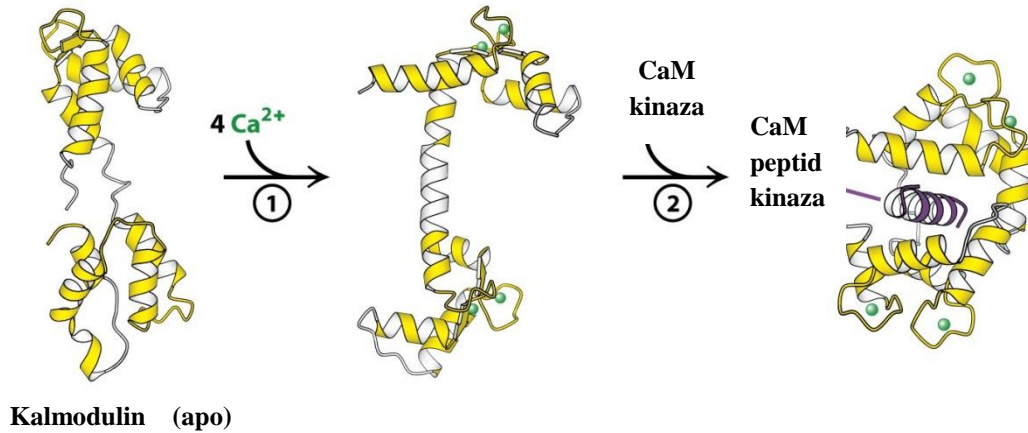


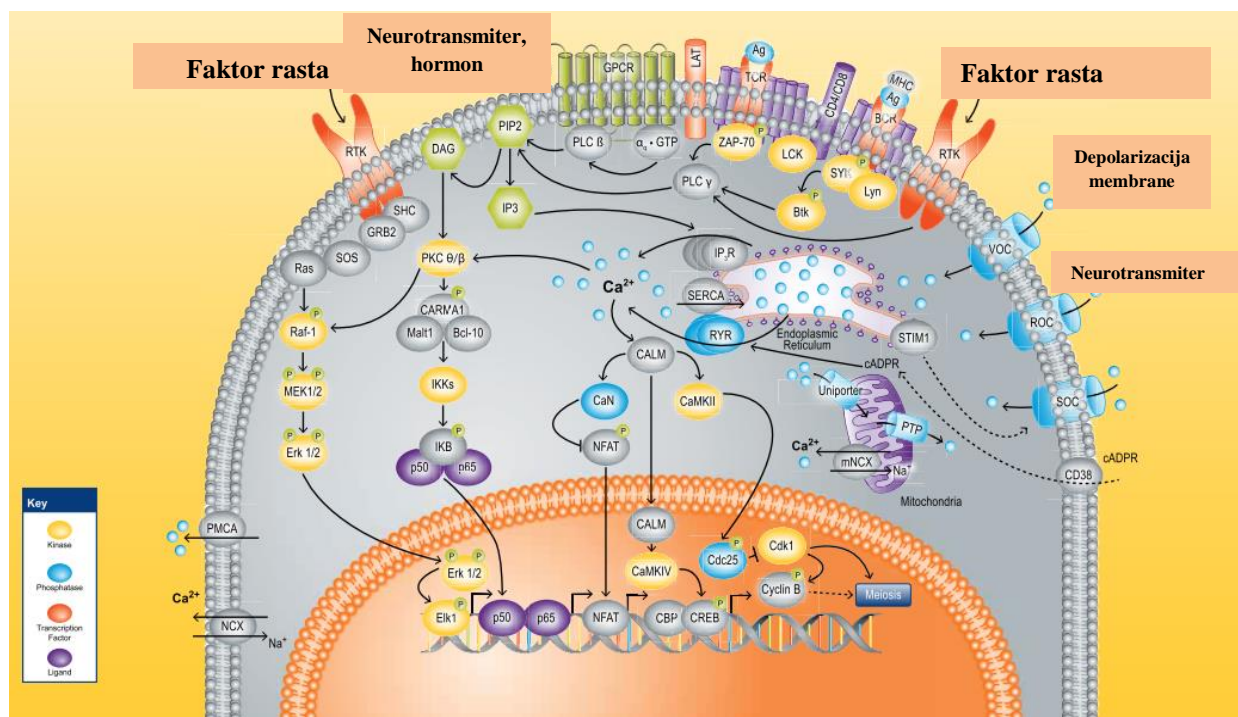
Figure 14-16b  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
 © 2007 W. H. Freeman and Company

**Slika 9.** Vezanje kalmodulina na  $\alpha$ -uzvojnica <sup>4</sup>

### 1.3.1.1 PROVOĐENJE SIGNALA

Specifični površinski stanični receptor prima signal iz okoliša te se primljena poruka zatim pretvara u drugačiji kemijski oblik. Postupak provođenja najčešće obuhvaća više stupnjeva. Signal se višestruko pojačava prije nego što izazove odgovor. Ukupni proces signalizacije je pod nadzorom sustava povratne sprege.

Većina signalnih molekula ne ulazi u stanice. Specifični proteini u staničnoj membrani djeluju kao receptori koji vežu signalne molekule i prenose u samu unutrašnjost stanice. Vezno mjesto na izvansaničnom dijelu, specifično prepoznaje signalne molekule (ligande). Za daljnji prijenos poruke sa kompleksa receptor-ligand služe male molekule koje nazivamo drugim glasnicima. Pri stvaranju drugih glasnika postoji mogućnost višestrukog pojačanja signala. Konačni učinak signalnog puta je poticanje crpki i enzima. Nakon završetka staničnog odgovora, signalni se proces mora prekinuti kako bi stanica mogla odgovoriti na novi signal. Signalni proces koji nije završen ispravno, može izazvati neželjene posljedice. <sup>4</sup>



Slika 10. Put provođenja signala<sup>10</sup>

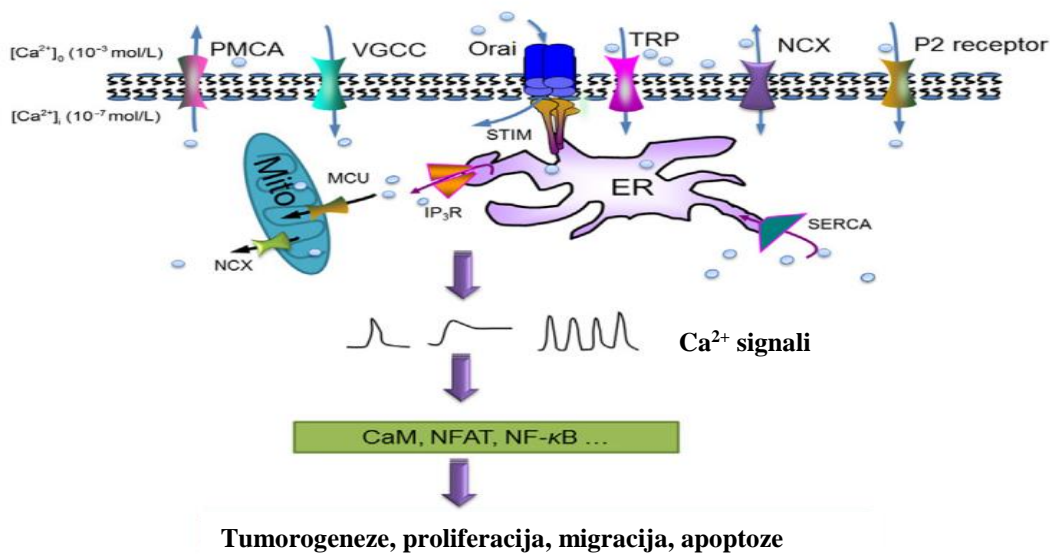
## 1.4 KALCIJ U STANICAMA RAKA

Promjena unutarstanične homeostaze  $\text{Ca}^{2+}$  može inicirati nastanak tumora. Produljeno unutarstanično povećanje  $\text{Ca}^{2+}$  može biti štetno te potaknuti staničnu smrt.  $\text{Ca}^{2+}$  signali mogu imati oblik valova ili šiljaka. Signalne oscilacije moraju biti prostorno-vremenski blisko regulirane. Kalcijev signal također ima ulogu u procesima važnim za rak kao što je proliferacija i migracija. Veličina, kinetika i prostorni profil citoplazmatskog  $\text{Ca}^{2+}$  signala sve je važniji u određivanju koji će kalcijev odgovor biti aktivan, kada, te koliko dugo. Stanice raka koriste iste kanale kalcija i pumpe kao i nemaligne stanice. TRP kanali su predloženi kao nova terapijska strategija. Kanali uključeni u biologiju raka su: CRAC, ORAI, STIM, arahidonat- regulirani  $\text{Ca}^{2+}$  kanal i SOCE. Među članovima  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-aza, SERCA je najbolji te odgovoran za nadopunjavanje endoplazmatskog retikuluma sa  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>8</sup>

**Tablica 1.** Kanali/ transporteri u stanicama određenog tipa raka

Kanali/transporteri		Tip raka
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> R 1	Gliom
	IP <sub>3</sub> R2	Limfocitna leukemija
	IP <sub>3</sub> R3	Glioma,želučani, rak d.crijeva,vrata i glave
Ca <sup>2+</sup> -ATPase	SERCA2	Rak debelog crijeva
	SERCA3	Tumori želuca,pluća, melanom
	SPCA1, SPCA2	Rak dojke
VGCC	Ca <sub>v</sub> 1.2	Rak debelog crijeva i jednjaka
	Ca <sub>v</sub> 2.3, Ca <sub>v</sub> 3.1	Gliom
	Ca <sub>v</sub> 3.2	Rak d.crijeva,prostate,jajnika
TRP	TRPC3	Rak dojke i jajnika
	TRPC6	Rak dojke i jednjaka, glioma
	TRPM1	Melanom
	TRPM7, TRPM8	Rak gušterače i rak dojke
	TRPV1, TRPV2	Rak mjehura i prostate
	TRPV4, TRPV6	Rak kože, prostate
Orai i STIM	Orai 1	Gliom, gušterača, bubrega
	Orai 3	Rak dojke, prostate, pluća
	STIM 1, STIM 3	Melanom, rak dojke

Promjenjena stanična lokalizacija, promjenjena aktivnost kroz mutacije gena i promjene u aktivnosti ili izražavanju, povezane su sa specifičnim procesima. Ove promjene se često održavaju u promjenama Ca<sup>2+</sup> protjecanja preko plazmatske membrane. Prijelaz Ca<sup>2+</sup> preko plazmatske membrane u stanicu, ključni je okidač ili regulator staničnih procesa za napredovanje tumora, uključujući proliferaciju, migraciju i apoptozu. <sup>7</sup>



**Slika 11.** Važni  $\text{Ca}^{2+}$  kanali / transporteri / pumpe vezani za razvoj raka <sup>7</sup>

## 2. TUMORI

Tumor označava skup izmjenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast tkiva. Nastanak tumora može uslijediti poremećajem regulacije bilo koje vrste stanica u tijelu, stoga razlikujemo više stotina različitih tumora. Tumor potječe od latinske riječi tumor koja označava oteklinu, a drugi naziv joj je još i novotvorina odnosno neoplazma. Rak je zloćudni tumor koji može biti opasan po život. Znanost koja se bavi proučavanjem novotvorina jest onkologija. Rast novotvorina može biti nesvrhovit, autonoman, parazitarni, nepravilan i neorganiziran.

## 2.1 POJEDINE TUMORSKE KLASIFIKACIJE

### 2.1.1 KLASIČNA KLASIFIKACIJA

**Tablica 2.** Klasična klasifikacija tumora

Klasična klasifikacija tumora	DOBROĆUDNI	ZLOĆUDNI
RAST	Ekspanzivan Polagan Nema lokalne invazije ni metastaza	Infiltrativan Brži rast Lokalna invazija Metastaze (širenje krv/limfa)
MAKRO	Oštro ograničen Dobro opskrbljen krvlju	Nepravilna oblika Česte nekroze
MIKRO	Diferencirane stanice (nalikuju zrelim stanicama) Kromatin raspršen Jezgrice neuočljive	Atipične stanice Pleomorfne jezgre Hiperkromatični kromatin Uočljive jezgrice i mitoze

### 2.1.2 HISTOGENSKA KLASIFIKACIJA TUMORA

Histogenska klasifikacija nam govori o tkivnom podrijetlu koje utvrđujemo mikroskopski. <sup>5</sup>

1. epitelni
2. mezenhimalni
3. tumori limfocita i hematopetskih stanica
4. neuralni tumori i srodne novotvorine
5. tumori potpornih stanica živčanog tkiva
6. tumori spolnih stanica

### 2.1.3 BIOLOGIJA TUMORSKOG RASTA

Proces tijekom kojeg se normalne stanice pretvore u tumorske stanice se naziva neoplastičnom pretvorbom. Genske razlike su kvantitativne i kvalitativne.

Glavne karakteristike progresije od normalne do maligne stanice:

1. Stalni poticaj na staničnu proliferaciju
2. Izbjegavanje usporavanja proliferacije
3. Izbjegavanje apoptoze
4. Gubitak ograničenja proliferacije
5. Neoangiogeneza
6. Invazija, metastaziranje i kolonizacija

Osim toga promjene u staničnom energetske metabolizmu i izbjegavanje imunološkog nadzora je također ključno u progresiji. Što su stanice manje diferencirane, brže rastu. <sup>5</sup>

Stupnjevi razvoja:

1. Inicijacija
2. Promocija
3. Konverzija
4. Progresija
5. Klonalna ekspanzija
6. Klonalna selekcija

### **3. METODA MJERENJA KONCENTRACIJE KALCIJA**

Površinski markeri pokazuju se korisnima za detektiranje promjena unutarstaničnog kalcija. Mjerenja  $\text{Ca}^{2+}$  se mogu povezati sa određenim fizičkim svojstvima stanica kao što su električna imedancija, indikator volumena stanice i pokazatelj veličine stanice. Mjerenje protoka kalcija u cjelovitoj krvi zahtjeva korake izolacije koji ometaju aktivaciju trombocita. Digitalna video mikroskopija, konfokalna laserska skenirana mikroskopija, a nedavno i multifoton mikroskopija je omogućila preciznu prostornu analizu intracelularne ionske aktivnosti. Konfokalna mikroskopija omogućuje točnu prostornu i vremensku analizu unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  uz mjerenje njegove koncentracije.

#### **3.1 RAZINE KALCIJA**

##### **3.1.1 NISKE RAZINE KALCIJA**

Niska razina kalcija u krvi naziva se hipokalcijemija, a uzrokovana je niskom razinom albumina u krvi. Hipokalcijemija s vremenom može zahvatiti mozak i uzrokovati neurološke simptome.

##### **3.1.2 VISOKE RAZINE KALCIJA**

Visoka razina kalcija u krvi naziva se hiperkalcijemijom. Hiperkalcijemiju mogu uzrokovati bilo povećana želučano-crijeva apsorpcija ili povećano uzimanje kalcija. Međutim, najčešći uzrok hiperkalcijemije je hiperparatireoza. Hiperkalcijemiju imaju često ljudi s rakom. Rak bubrega, pluća ili jajnika često luči velike količine proteina koji imaju učinke slične onima paratireoidnog hormona.

## 3.2 CITOMETRIJA

Za visoku preciznost analiza, protočni citometar zahtjeva da se tok tekućine za prijenos stanica prenosi glatko na relativno sporij brzini. Tijekom umjeravanja citometrije za detekciju  $\text{Ca}^{2+}$  koristi se ionomicin koji služi kao stanica koja propušta mjerenja unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$ . Citometrija je izvrsna metoda za analizu heterogenosti stanica radi promjena u unutarstaničnom  $\text{Ca}^{2+}$ . Prednosti citometrije su osjetljivost sustava na mjerenja s istim stanicama iz velikog broja stanica, te sortiranje stanica na temelju promjene u  $\text{Ca}^{2+}$ . Isto tako postoje i određena ograničenja. Specifične stanice se teško izoliraju ako nemamo smjesu različitih stanica već jednoličnu suspenziju.<sup>9</sup>

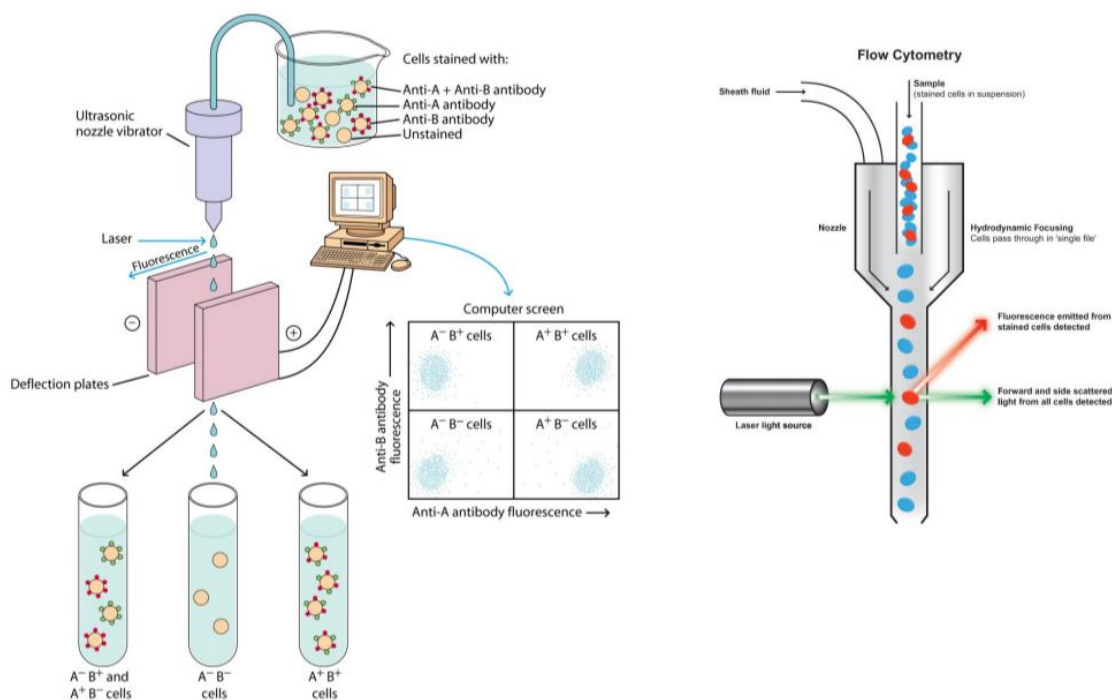
**Tablica 3.** Prednosti i ograničenja citometrije

PREDNOSTI	OGRANIČENJA
Definiranje heterogenosti	Teža kontrola koncentracije izvanstaničnog $\text{Ca}^{2+}$
Definiranje ciljane populacije stanice	Teže pružanje kinetičke analize
Kombinacija s drugim bojama i indikatorima	Nemogućnost praćenja stanice s vremenom
	Ograničen raspon valnih duljina
	Teža kalibracija

## 3.3 DRUGE METODE VEZANE ZA CITOMETRIJU

Polietilen glikol (PEG) mikrosfere su karakterizirane protočnom citometrijom i fluorescencijom. PEG su polimerne čestice koje imaju sposobnost adsorpcije organskih spojeva i smatra se glavnim nosačem lijeka. U prisutnosti SIgA primijećeno je povećanje postotka apoptotičkih stanica. Najviši apoptozni indeks je opažen kada su stanice tretirane sa PEG mikrosferama s adsorbiranom SIgA. Kolostralni SIgA adsorbiran PEG mikrosferama ima antitumorski učinak na ljudske MCF – 7. Pročišćeni SIgA je prilagođen za 4 g/L do koncentracije od 100 ng/mL. Alikvoti se pohranjuju na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a zatim upotrebljavaju za pokuse.





Slika 12. Protočni citometar<sup>9</sup>

#### 4. FLUOROSCENTNI INDIKATORI

Izbor kombinacije fluorescentnih boja ili boja za otkrivanje  $\text{Ca}^{2+}$  ovisi i o protočnoj citometriji i laserskom sustavu koji će se koristiti. Najčešće korišteni  $\text{Ca}^{2+}$  indikatori su kemijski fluorescentne sonde. Postalo je popularno koristiti više boja za analizu različitih parametara.

Indikatori kalcija kategorizirani su u nekoliko skupina po njihovim emisijama:

1. Skupina s plavim emisijama: quin 2, indo 1, benzotiaza i fura 2
2. Skupina zelenih: fura 2, BTC, fluo 3, kalcij zelena i BAPTA
3. Žuta i narančasta skupina: kalcij narančasta, kalcij tamnocrvena i rhod 2
4. Crveno i blizu infracrvene emisije: fura crveno

Druga razmatranja u odabiru pokazatelja jest njihova kemijska forma. No, ipak najvažnije razmatranje pri odabiru indikatora je njegov  $\text{Ca}^{2+}$  vezujući afinitet koji se odražava u konstanti

disocijacije. Pokazatelji visokog afiniteta mogu emitirati svijetlu fluoroscenciju i puferirati unutarstanični  $\text{Ca}^{2+}$ . Jedan od razloga upotrebe indikatora sa niskim afinitetom je radi mjere razine  $\text{Ca}^{2+}$  u subcelularnim organelima.

Laserski sustavi temeljeni na UV tehnologiji zahtjevaju specijalizaciju optičke komponente koja povećava trošak i smanjuje ukupni intezitet signala. UV zračenje je više citotoksično od zračenja drugih valnih duljina. <sup>9</sup>

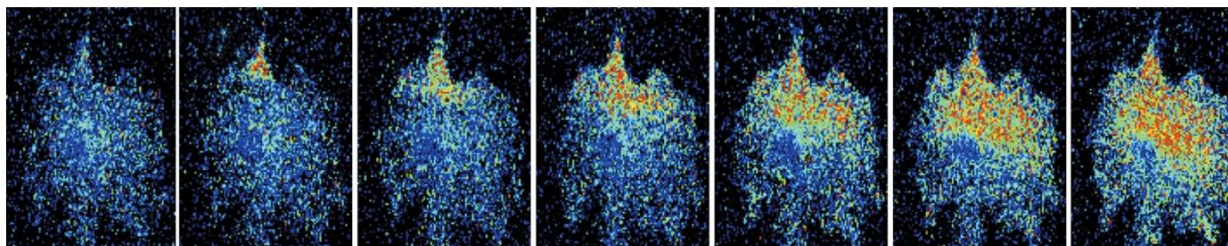


Figure 14-14b  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
© 2007 W.H. Freeman and Company

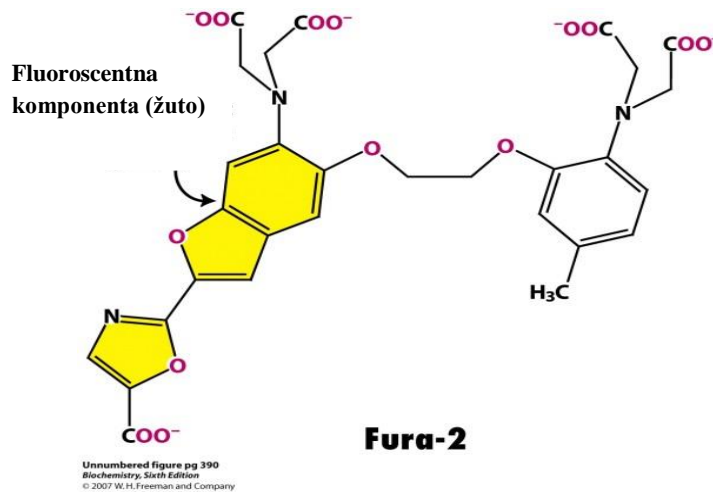
**Slika 13.** Serijski prikaz širenja kalcija u stanici <sup>4</sup>

#### POJEDINI INDIKATORI:

- Quin - 2:
  - puferira stanični  $\text{Ca}^{2+}$
  - nakon uzbude na 339 nm, pokazuje se 5-6 puta povećanje emisije fluoroscencije kada je vezan na  $\text{Ca}^{2+}$ , a emitirana fluoroscencija se smanjuje kad se uzbudi na 365 nm.
- Indo - 1:
  - trenutno se kvantitativna, ratiometrijska  $\text{Ca}^{2+}$  mjerenja provode sa indo 1 obilježenim trombocitima koji koriste UV lasere. Nakon UV ekstrakcije imamo raspon od plave do ljubičaste ( omjer ljubičaste i plave otkriva unutarstanični  $\text{Ca}^{2+}$  )
  - ima prednost nad quin 2 radi: veća selektivnost za  $\text{Ca}^{2+}$ ; pomak valne duljine emisije nakon vezivanja  $\text{Ca}^{2+}$ ; povećana kvantna učinkovitost fluoroscencije i manji afinitet za  $\text{Ca}^{2+}$

- Fura - 2:
- ionski indikatori djeluju kao kelatori za određeni ion, a zatim vezanje iona na indikator mijenja svojstva fluoroscencije

Druge opcije obilježavanja trombocita mogu biti sa fluo 3 ili fura redom. Fura red svijetli u odsutnosti  $\text{Ca}^{2+}$ .



Slika 14. Fura-2 <sup>4</sup>

## 5. ZAKLJUČAK

- Ljudski organizam izgrađen je od brojnih minerala, a kalcij je jedan od najzastupljenijih.
- Jako je bitan za vitalne funkcije i signalne puteve kod čovjeka.
- Signalni proces koji nije završen ispravno, može izazvati neželjene posljedice.
- Promjena unutarstanične homeostaze  $\text{Ca}^{2+}$  može inicirati nastanak tumora. Produljeno unutarstanično povećanje  $\text{Ca}^{2+}$  može biti štetno.
- Kako bi se spriječilo stvaranje slabo topljivih soli, unutarstanične razine  $\text{Ca}^{2+}$  se moraju održavati niskima, a to se postiže pumpanjem  $\text{Ca}^{2+}$  iz citoplazme u izvanstanični prostor. Prihvatljiva razina kalcija je od 6,7 do 8,8mg/dL krvi jer u suprotnom dolazi do stanja hiperkalcijemije.
- Metode mjerenja kalcija su s vremenom uznapredovale, a jedna od preciznijih je protočna citometrija.

## 6. LITERATURA

1. *Filipović I., Lipanović S.*; Opća i anorganska kemija; ŠKOLSKA KNJIGA, Zagreb, 1995. 897
2. *Guyton A.C.*; Fiziologija čovjeka i mehanizmi bolesti; MEDICINSKA NAKLADA, Zagreb, 1995. 212
3. *Cooper A.*; Biophysical Chemistry; RSC Pub, (2004.)
4. *Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L.*; Biokemija; ŠKOLSKA KNJIGA, Zagreb 1991. 389, 360, 356, 391, 389
5. *Damjanov I., Seiwerth S., Jukić S., Nola M.*; Patologija, peto prerađeno i dopunjeno izdanje; MEDICINSKA NAKLADA; Zagreb, 2018.
6. *Abzhanov A., Kuo W.P., Hartmann C., Grant B.R., Grant P.R., Tabin C.J.*; The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches; NATURE;( 2006); **442**: 563-567
7. *Chaochu Cuia,b, Robert Merrittb,c, Liwu Fua, Zui Panb,c,d,n*; Targeting calcium signaling in cancer therapy; China, (2016.); **7**: 3–17
8. *Gregory R.Monteith, Felicity M. Davis, Sarah J. Roberts-Thomson*; Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences; The Journal Of Biological Chemistry; 287: **38**; 31666- 31670
9. *Scott W. Burchiel,\* Bruce S. Edwards,† Fritz W. Kuckuck,† Fredine T. Lauer,\* Eric R. Prossnitz,‡ John T. Ransom,§ and Larry A. Sklar*; Analysis of Free Intracellular Calcium by Flow Cytometry: Multiparameter and Pharmacologic Applications; **21**; 221- 229
10. Calcium Signaling pathway; <https://www.abcam.com/pathways/calcium-signaling-interactive-pathway>
11. *Jessica L. Gifford, Michael P. Walsh, Hans J. Vogel*; Structures and metal-ion- binding properties of the Ca<sup>2+</sup>- binding helix- loop- helix EF- hand motifs; Biochemical Journal; (2007) , **405**; 199-221

