



**Нана Владимировна  
Войтенко**

**Универсальный, вездесущий  
свободный кальций - методы  
измерения**

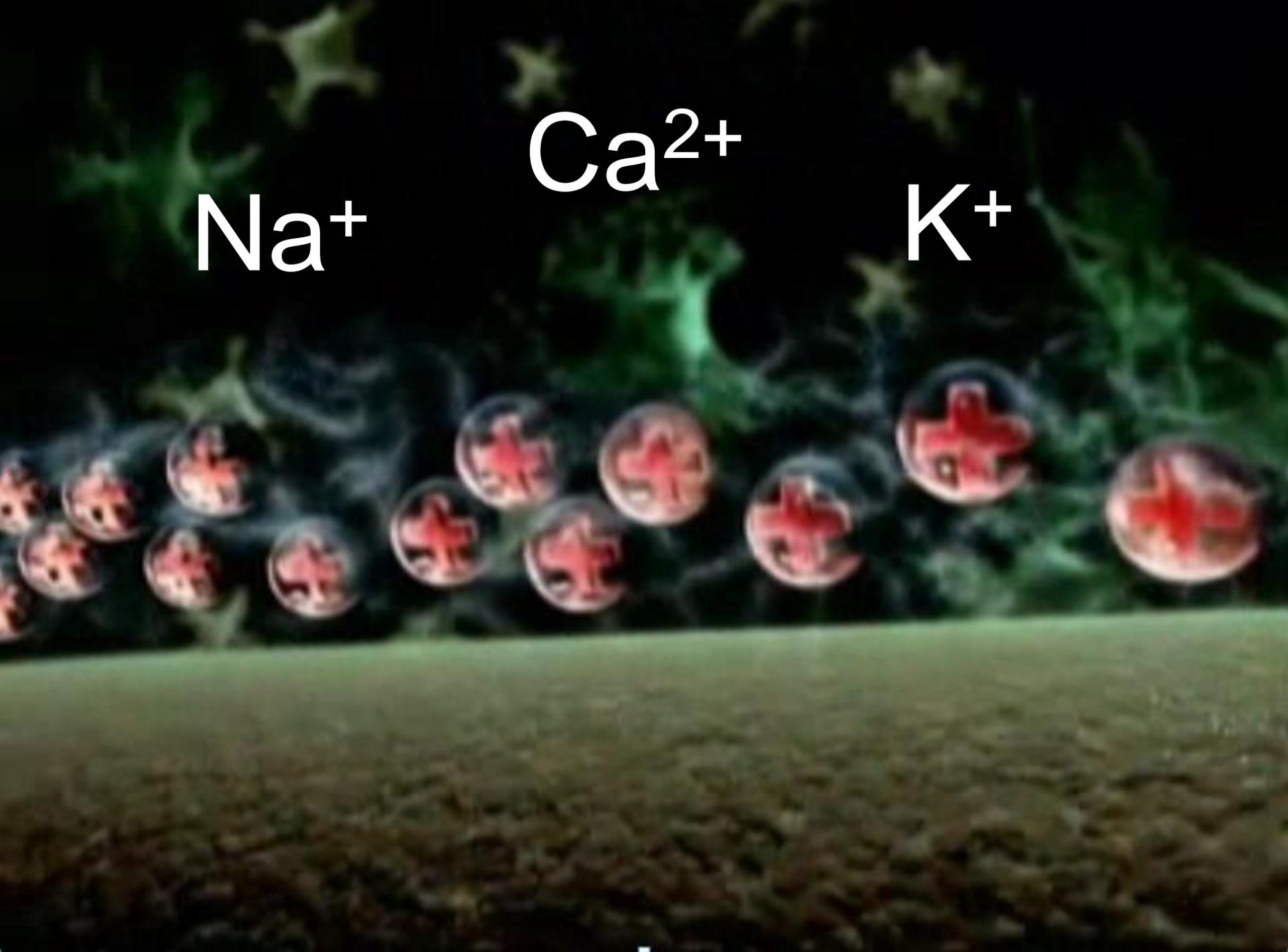
**Киев 2018**

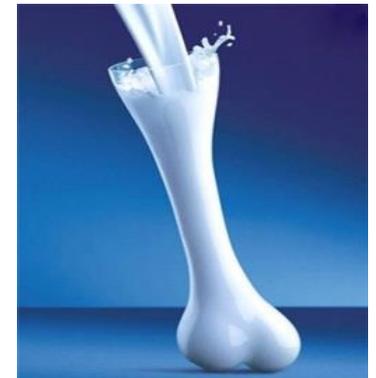
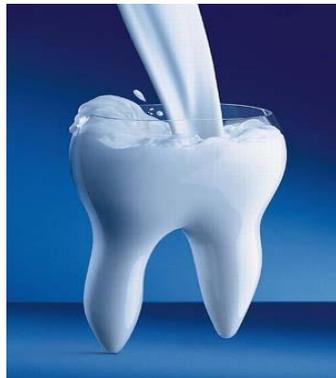
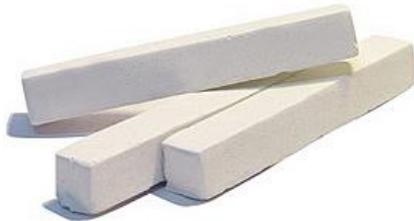


$\text{Na}^+$

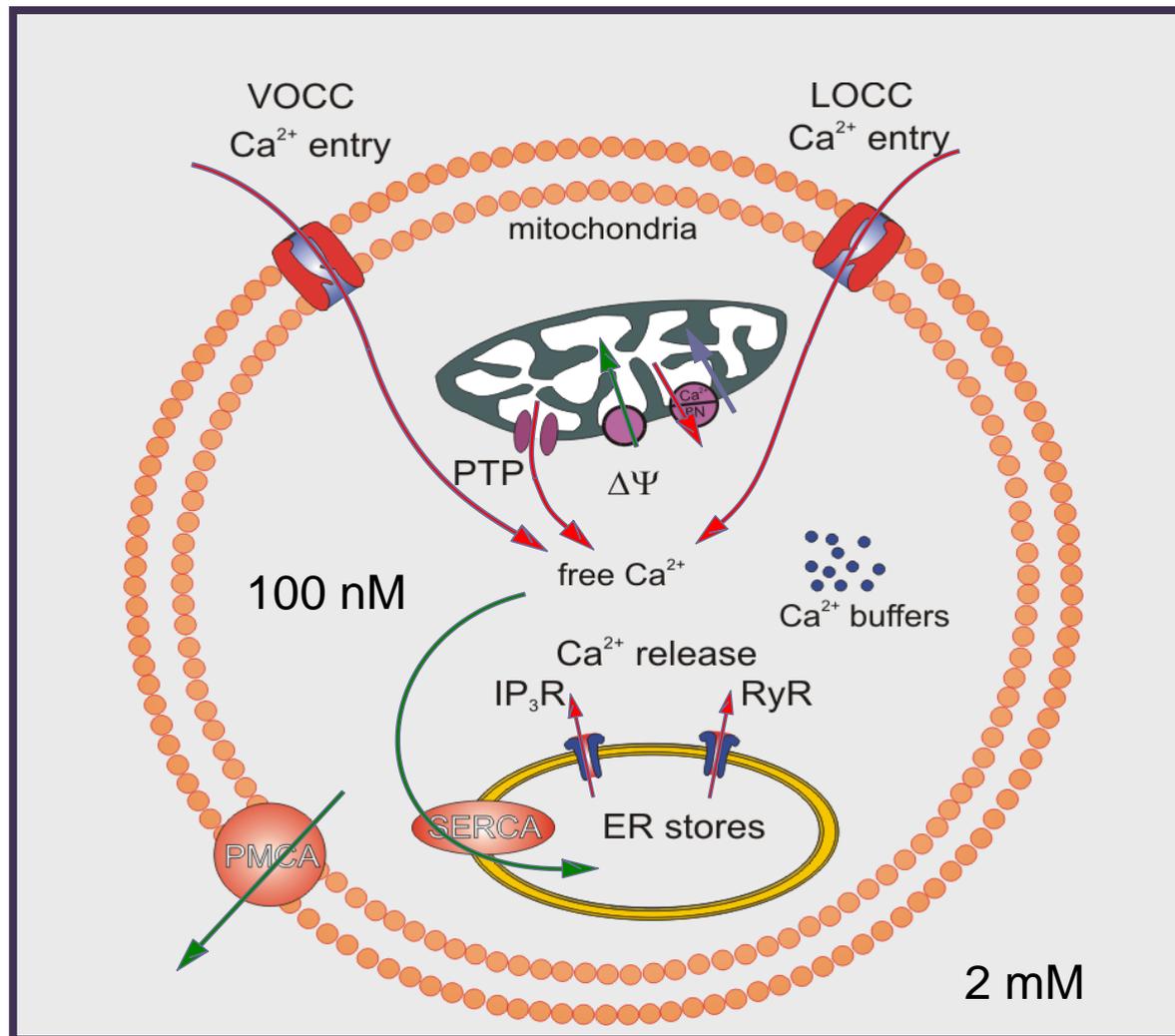
$\text{Ca}^{2+}$

$\text{K}^+$

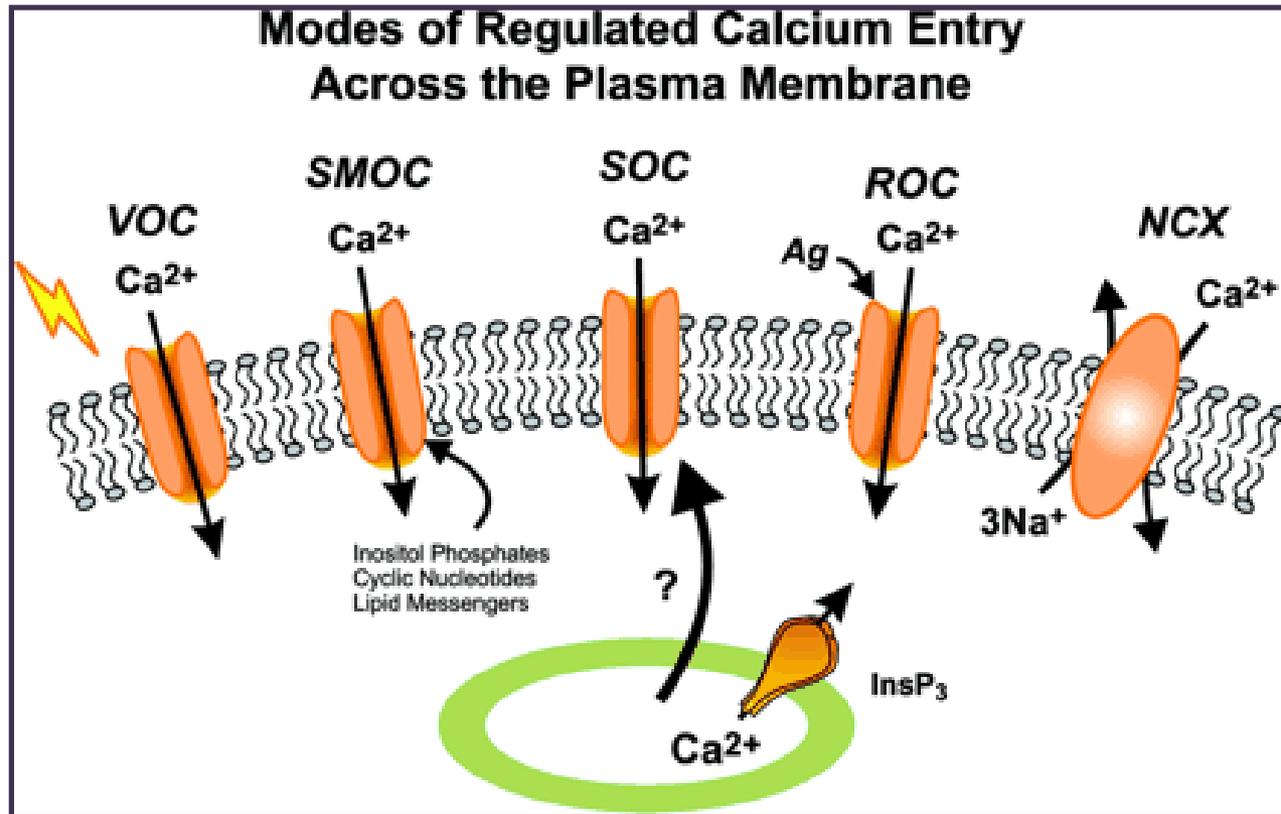




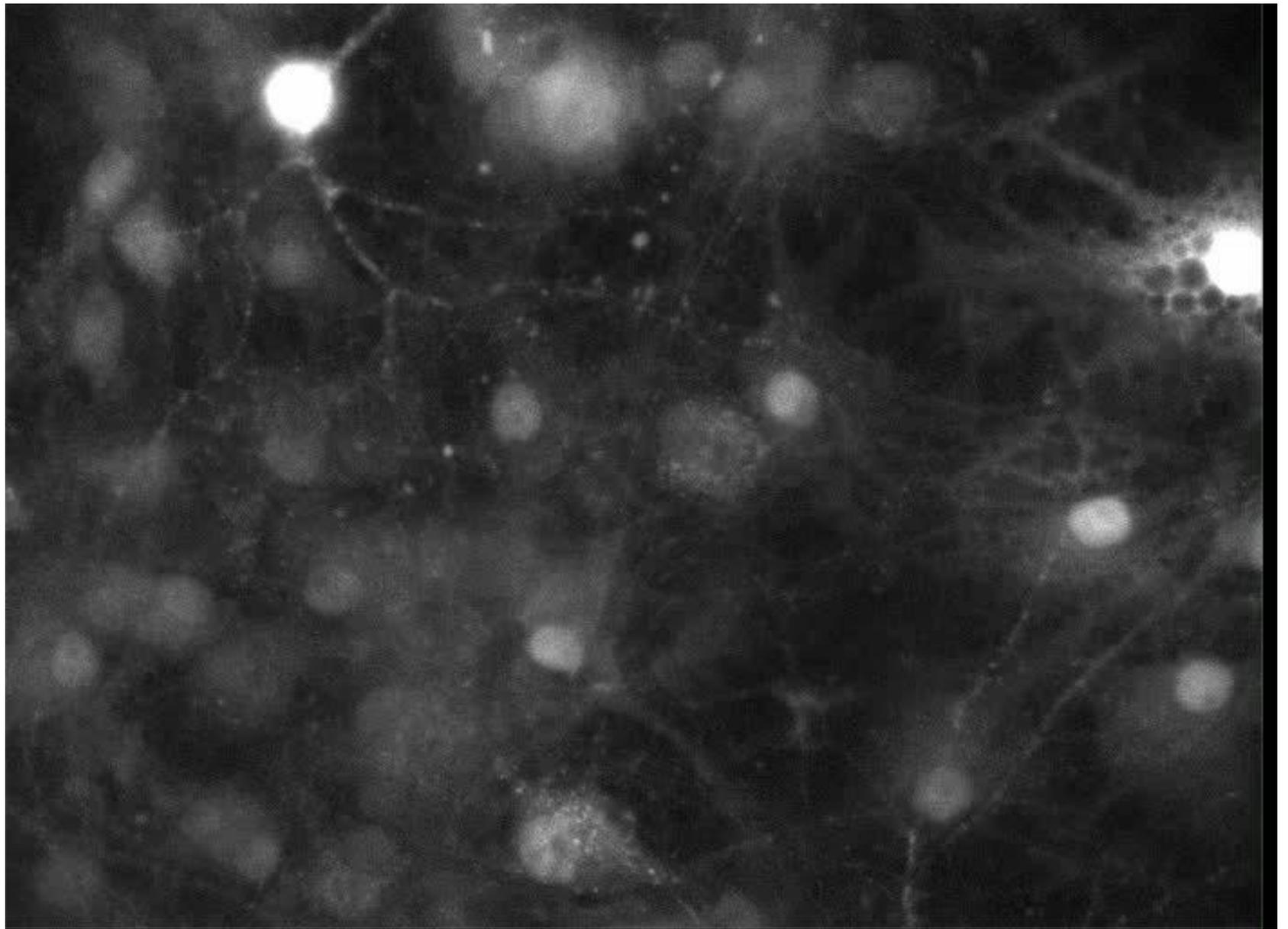
# Механизмы кальциевой регуляции в нервной клетке



# Кальцивые каналы





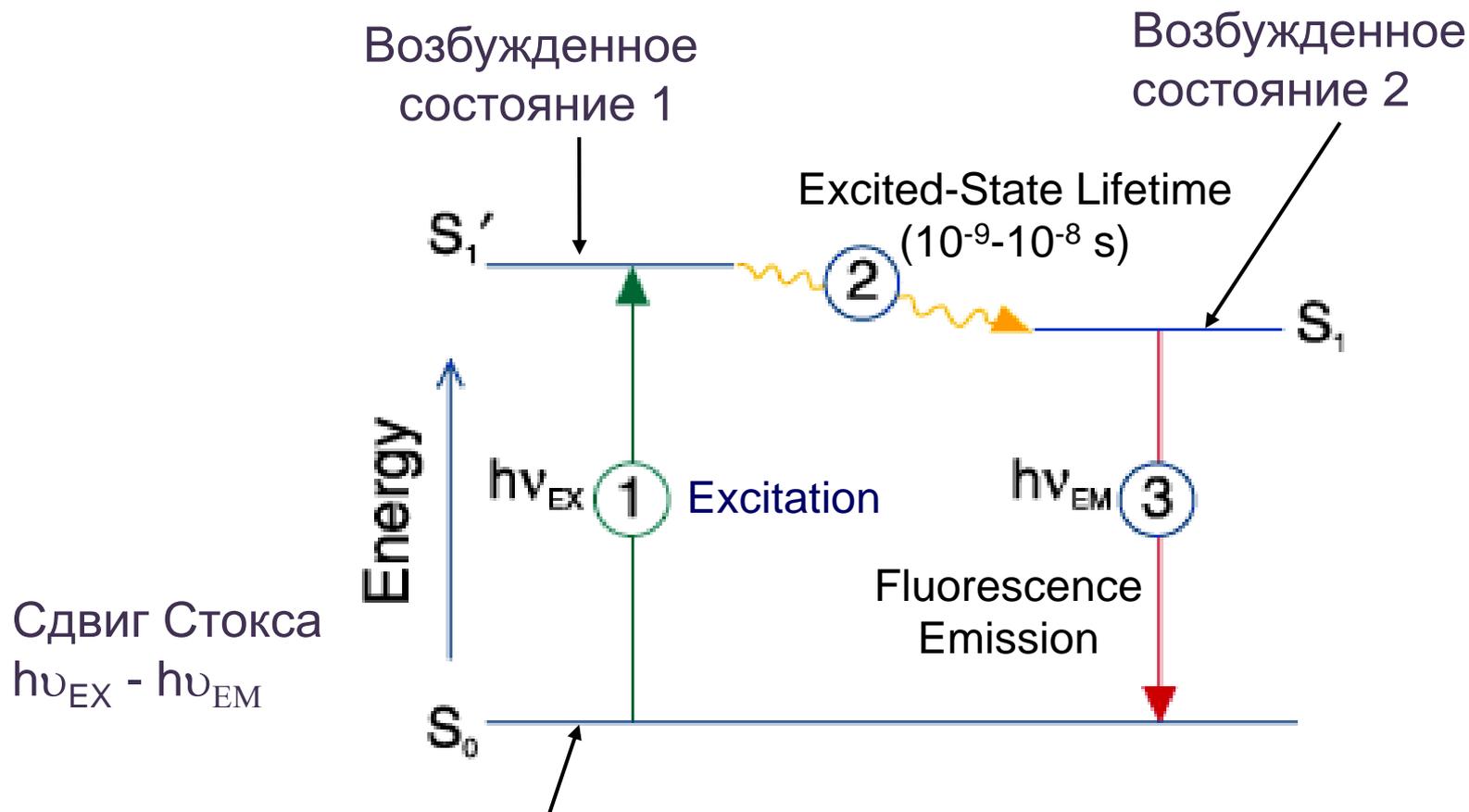


# **ВАЖНО**

- **Ионы кальция невозможно визуализировать**
- **Существуют специальные молекулы, которые меняют свои оптические свойства при связывании с ионами кальция**
- **Концентрация ионов кальция может изменяться за миллисекунды**

# Флуоресценция

- Является результатом возбуждения молекул - флуорофоров или флуоресцентных зондов
- Характеризуется: поглощением, временем жизни, интенсивностью, спектрами возбуждения и излучения
- Является результатом трехступенчатого процесса:
  - Возбуждение
  - Пребывание в возбужденном состоянии
  - Эмиссия флуоресценции



## Квантовый выход флюоресценции

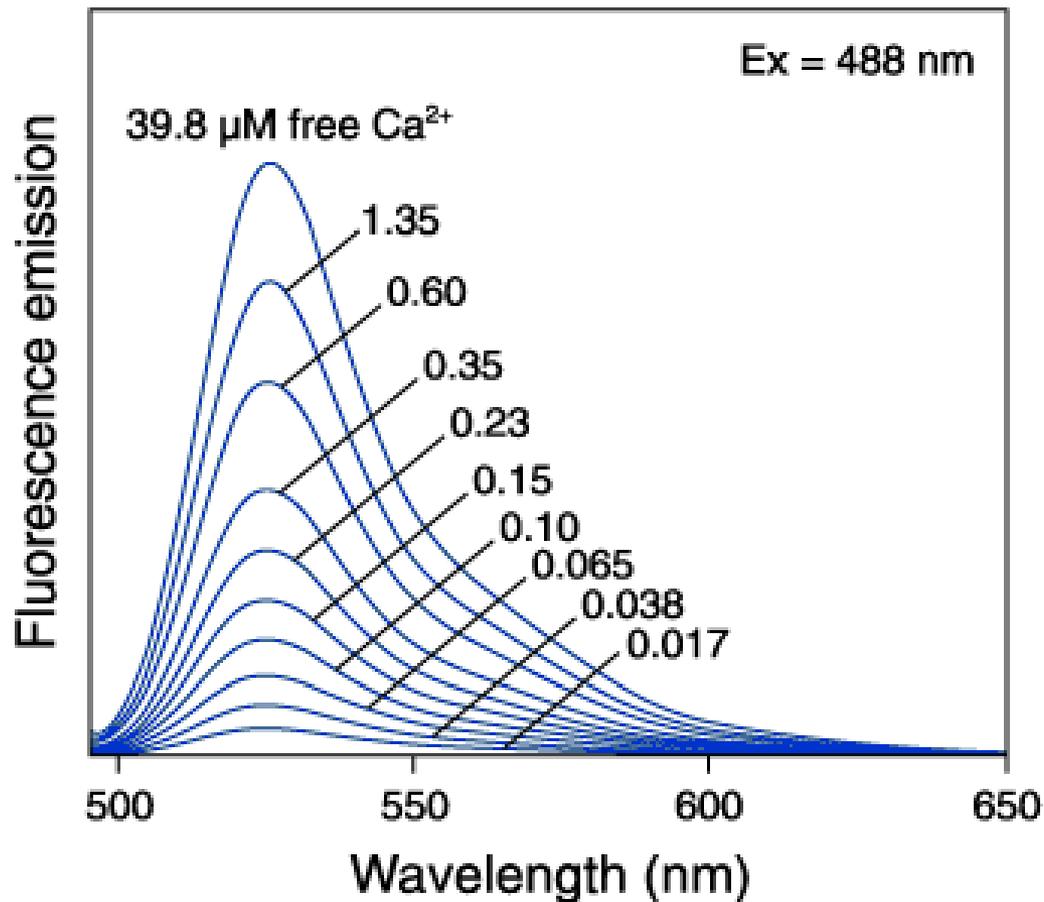
Число излученных фотонов (ступень 3)

Число поглощенных фотонов (ступень 1)

# Флуоресцентные зонды: критерии выбора

- Измерение
  - Качественное или количественное
  - В каком клеточном компартменте
- Диапазон кальциевой концентрации
  - Константа диссоциации ( $K_d$ )
  - Возможность детекции от  $0.1K_d$  до  $10K_d$
- Метод загрузки
- Другие физиологические параметры
  - Одновременный patch-clamp

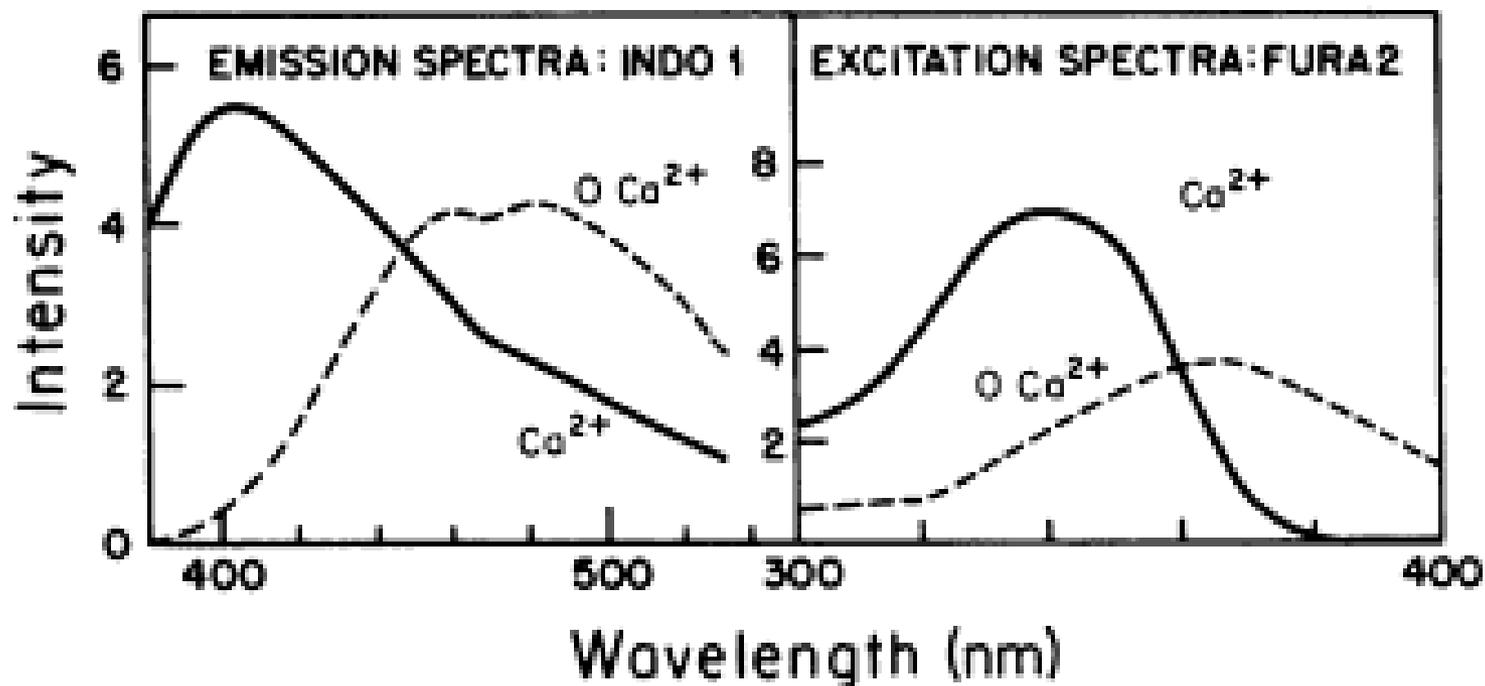
# Ca<sup>2+</sup>-зависимый спектр флуоресцентного излучения Fluo-3



# Двухволновые флуоресцентные зонды

## Ультрафиолетовое возбуждение

Fura-2, Indo-1 и их производные



# Grynkiewicz equation

$$[Ca^{2+}]_i = K_d^* \times \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right)$$

где R - is the measured two-wavelengths fluorescence ratio,  $R_{min}$  is the ratio at zero  $[Ca^{2+}]$ ,  $R_{max}$  is the ratio for a saturating  $[Ca^{2+}]$ ,  $K_d^*$  represents the *apparent* dissociation constant for  $Ca^{2+}$  binding to the dye. To be able to estimate  $[Ca^{2+}]_i$ , the free  $[Ca^{2+}]$  needs to be related to a value of the two-wavelengths fluorescence ratio. To do so, it is necessary to undergo a calibration procedure in order to determine the  $K_d^*$  parameters.

# Способы детекции ионов кальция

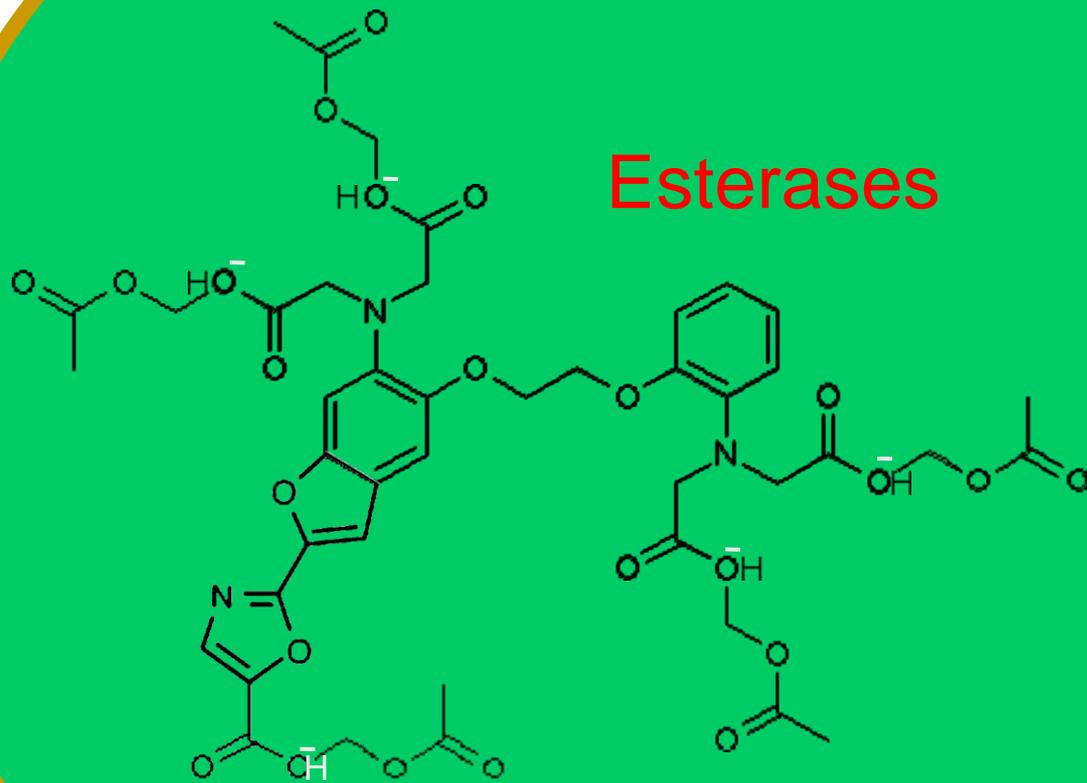
- Химические красители
- Кальций-чувствительные белки
- Генетические красители

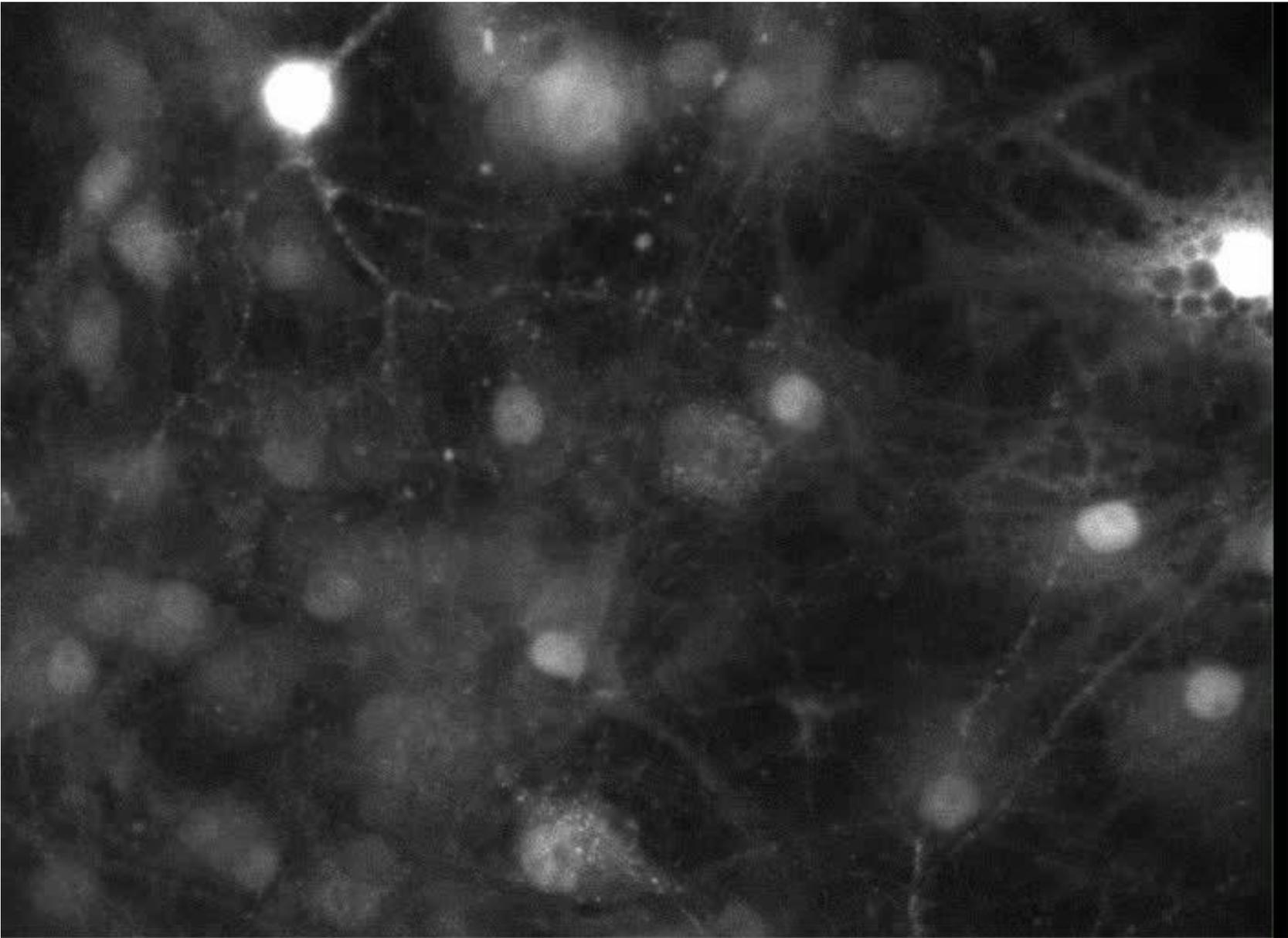
# Процедури загрузка зонда

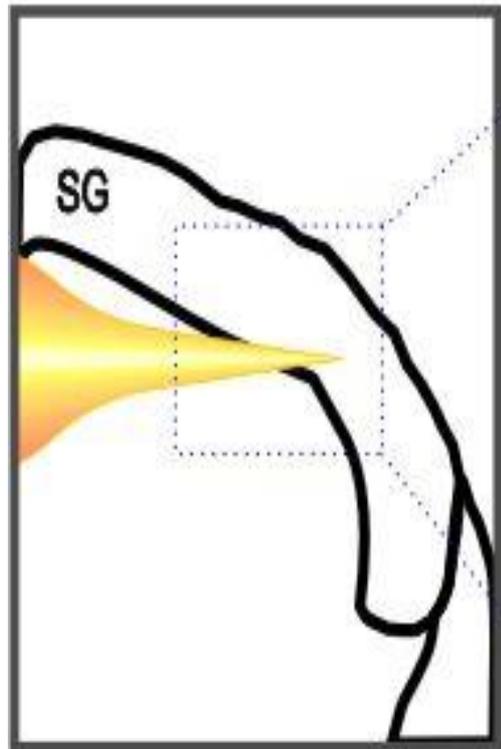
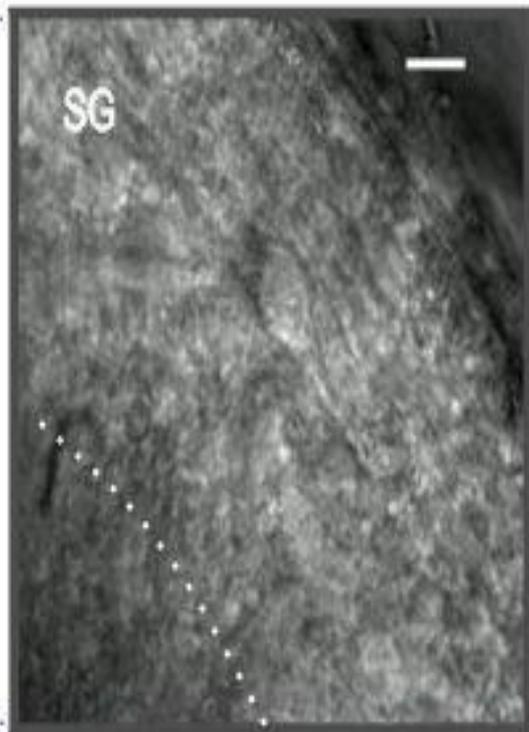
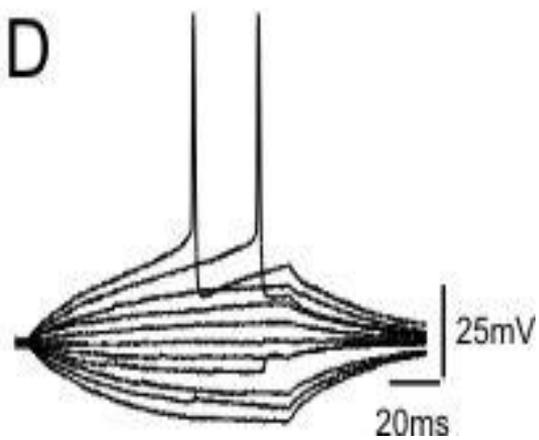
- Загрузка AM-форм (эфирных) красителя
- Микроинъекция
- Загрузка через Patch-Clamp пипетку

# Fura2 AM

Esterases



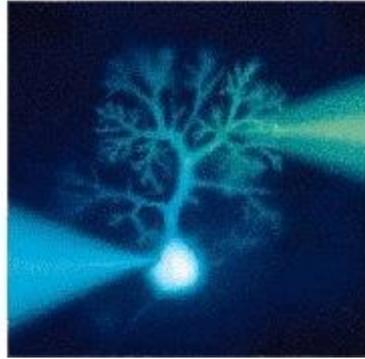


**A****B****C****D**

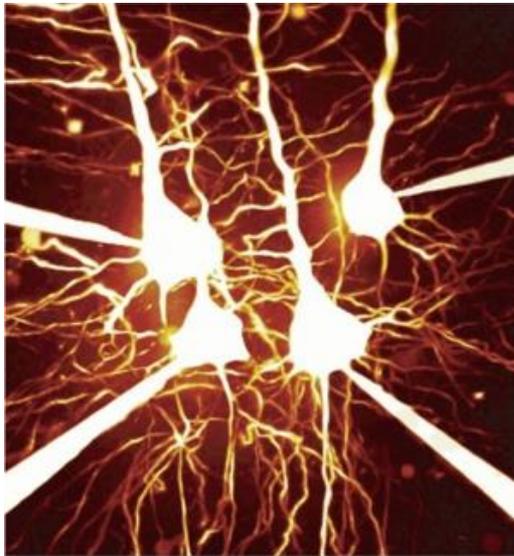
A



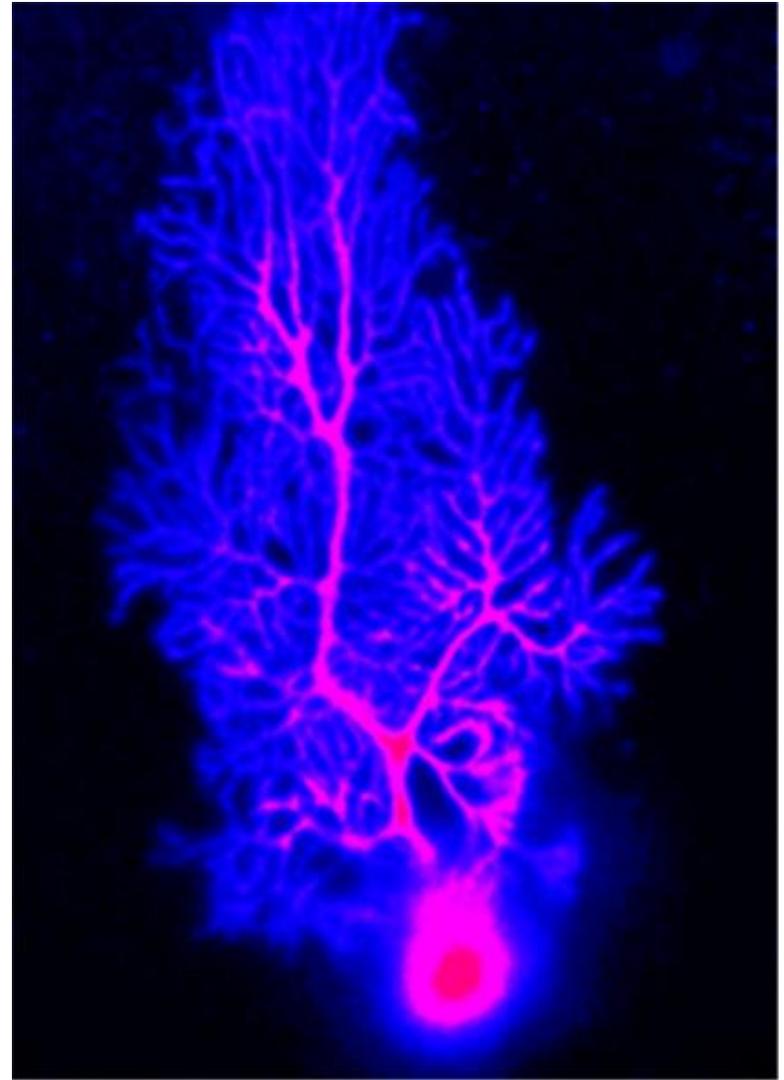
B



Simultaneous somatic and dendritic patch-clamp recording from a Purkinje cell in a cerebellar cortex slice. A, infrared differential interference contrast image. B, fluorescence image

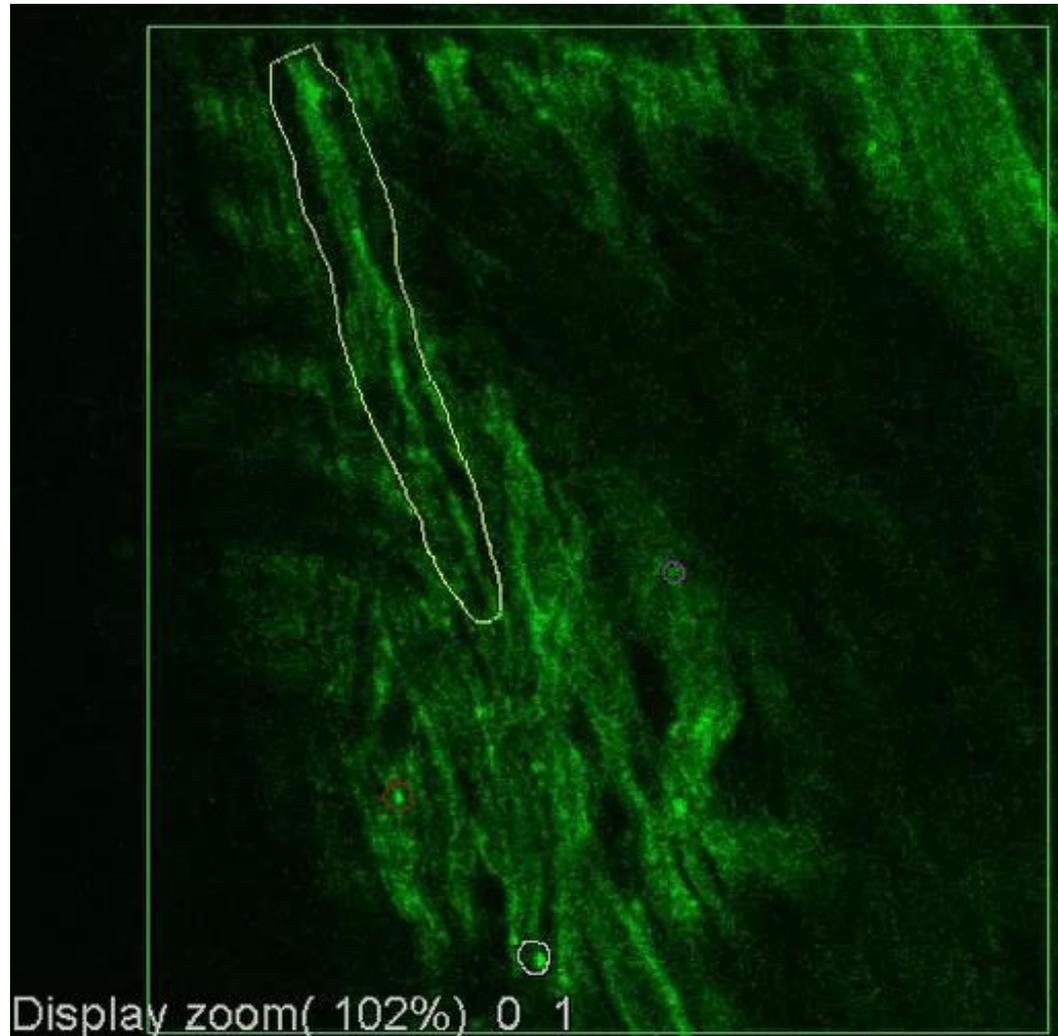
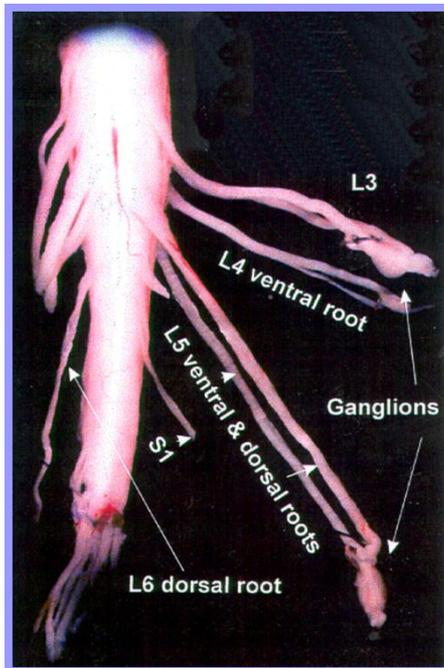


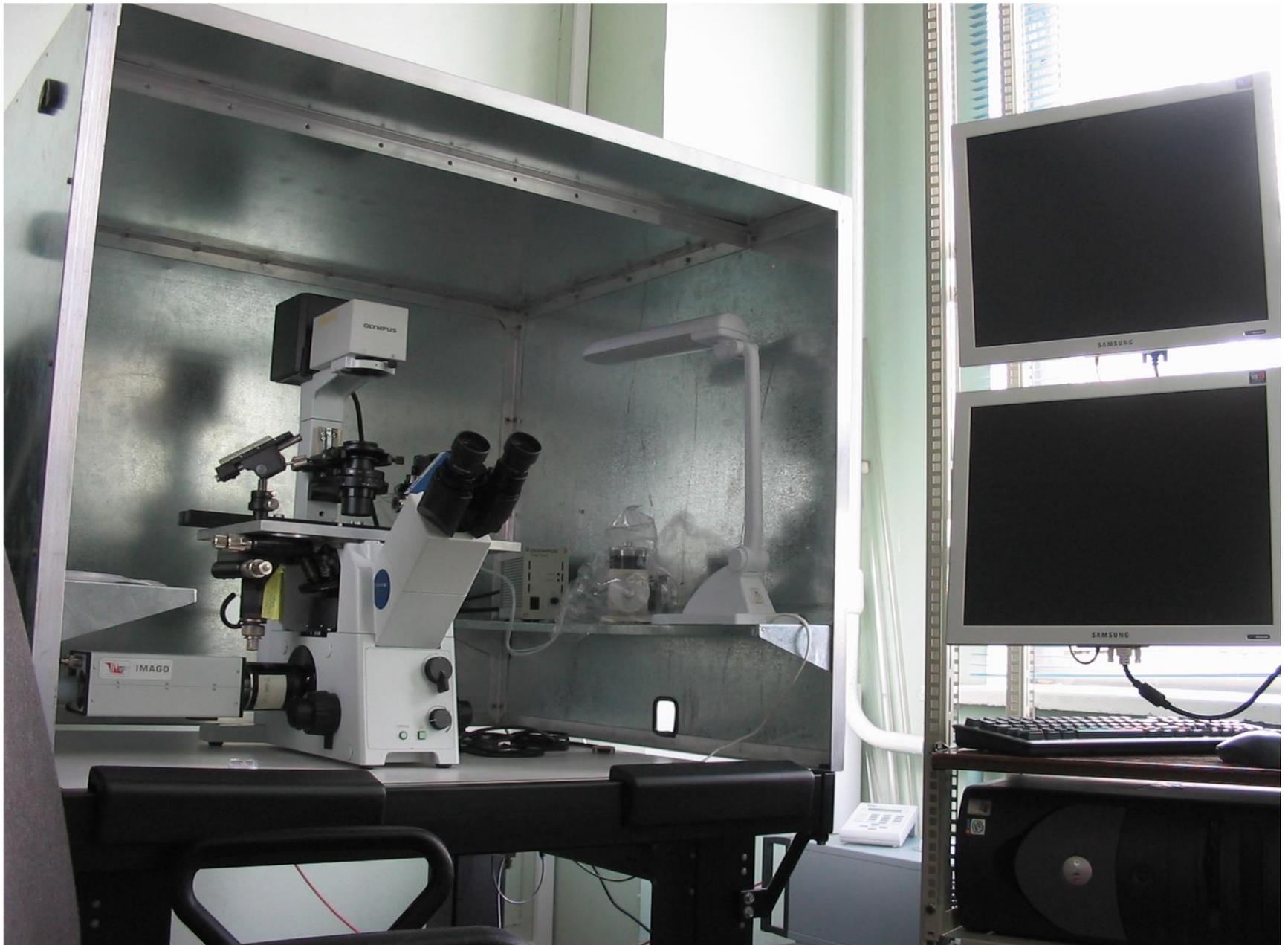
Simultaneous quadruple patch-clamp recording from layer 5 pyramidal neurons in a cortical brain slice. Neurons were filled with a fluorescent calcium indicator and imaged with 2-photon laser-scanning microscopy.



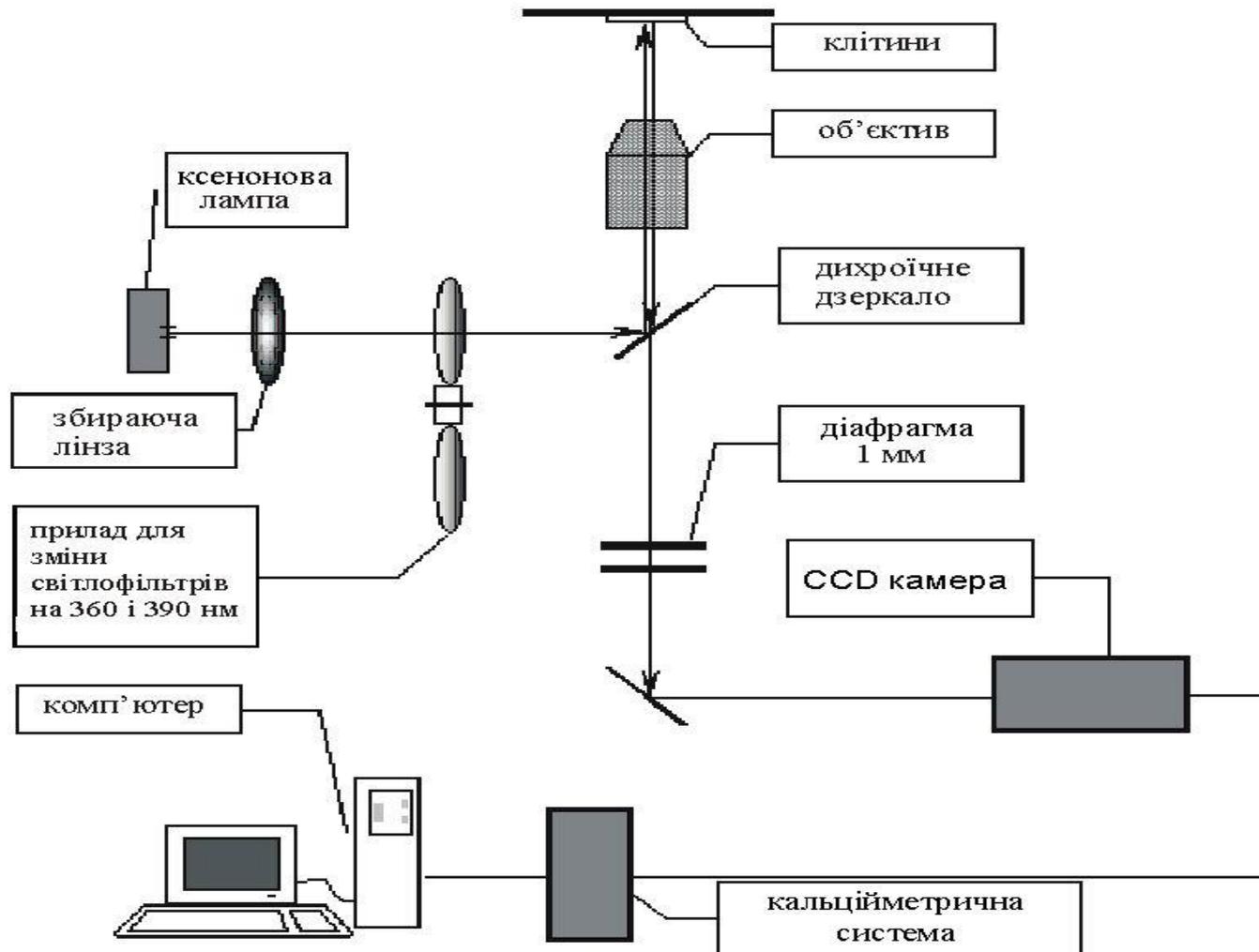
Hot calcium in a Purkinje neuron.

# Ca<sup>2+</sup> imaging in central axons of DRG neurons in PIRT-GCamp3 mice





# Експериментальна установка для визуалізації кальція с помощью красителя fura-2



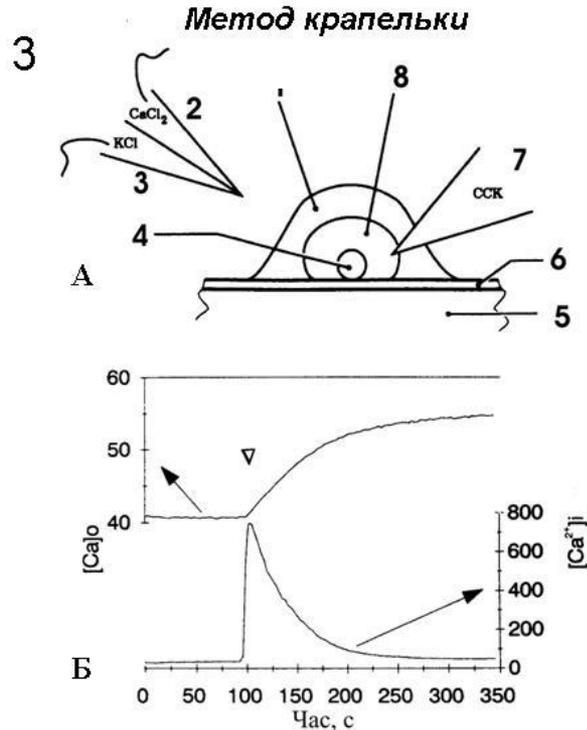
# Метод капельки



Проф. Алексей Тепикин  
Ливерпульский Университет



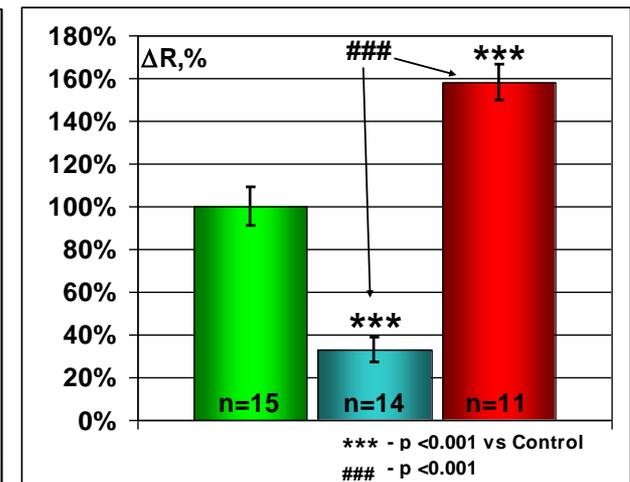
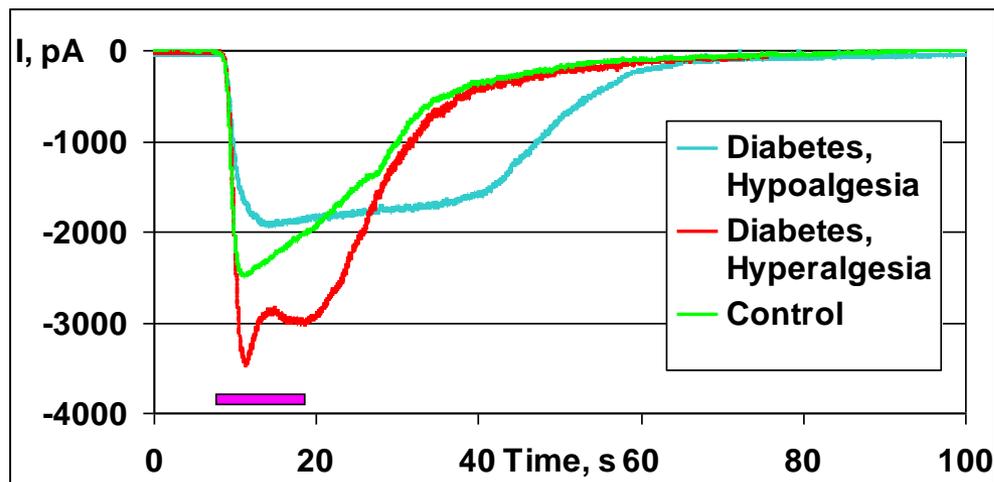
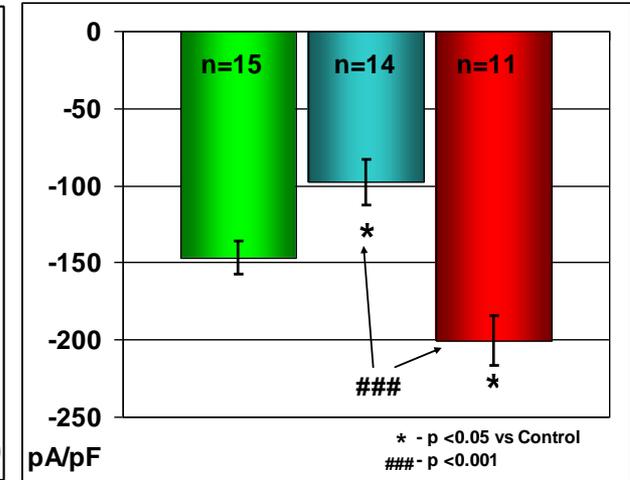
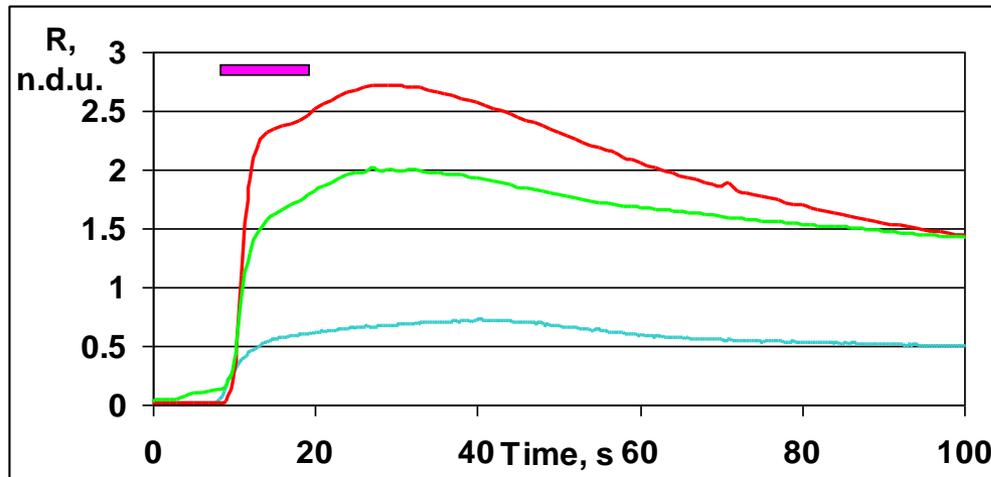
Проф. Павел Белан  
Институт физиологии  
им. А.А. Богомольца

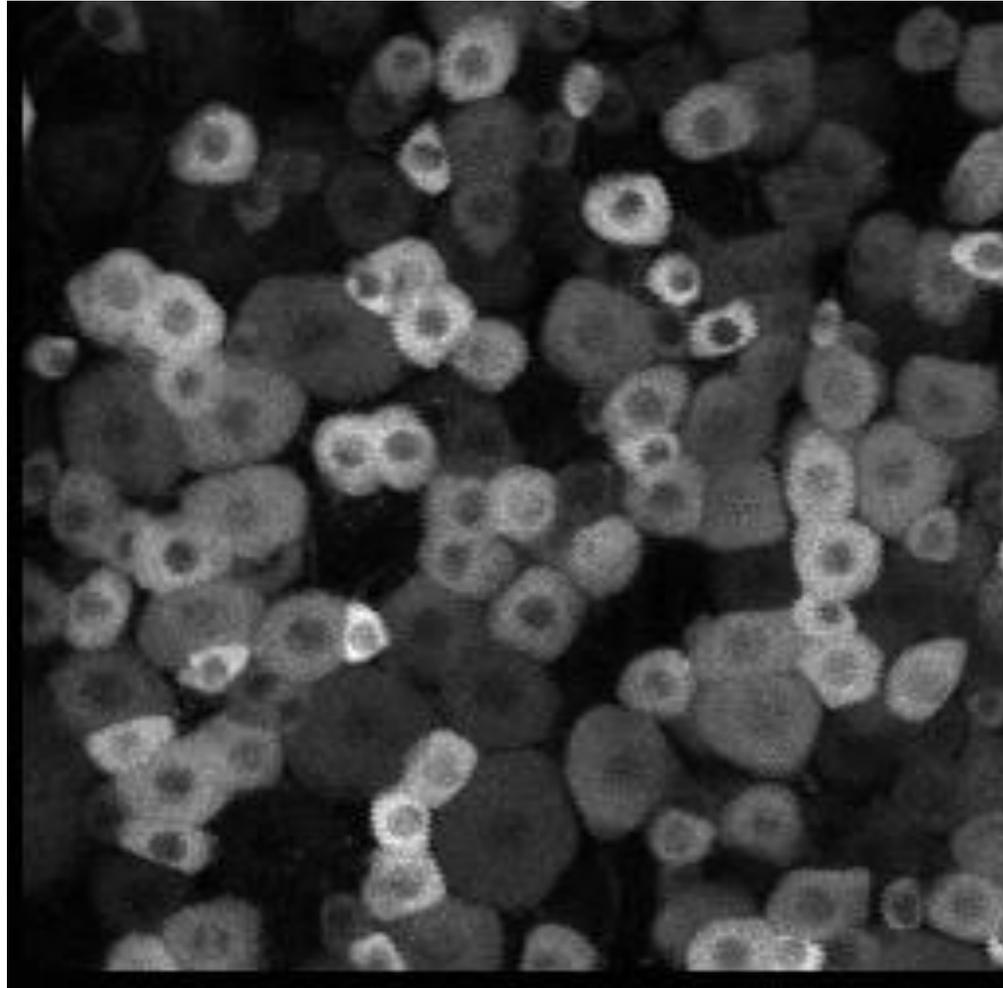


**А.** Схематичний рисунок, пояснюючий проведення експериментів з крапелькою. 1 - Мінеральна олія, 2 - хлорид кальцію, 3 - хлорид калію, 4 - клітина, наповнена кальцій – чутливим барвником, 5 - покривне скельце, 6 - шар силікону, 7 - агоніст мобілізації кальцію у цитозоль ацидарних клітин – холецистокінін (ССК), 8 - інший кальцій – чутливий барвник у зовнішньоклітинному розчині у крапельці.

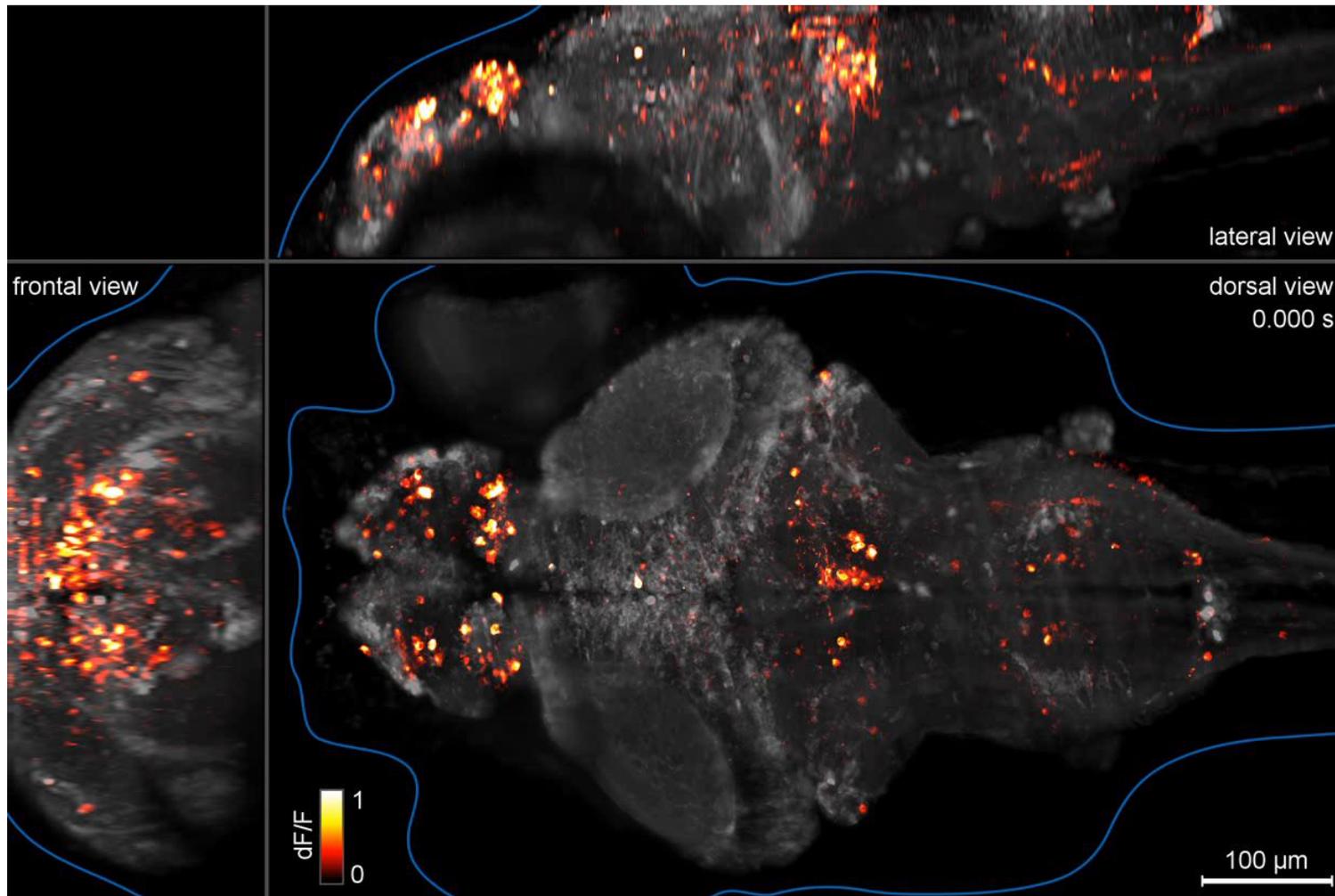
**Б.** Приклад вимірювань у краплинці. Зміни концентрації вільного внутрішньоклітинного кальцію (нижня крива, права вісь, нМ) і загального зовнішньоклітинного кальцію ( $[Ca^{2+}]_o$ ) (верхня крива, ліва вісь, мМ) як результат стимуляції високою дозою ССК.

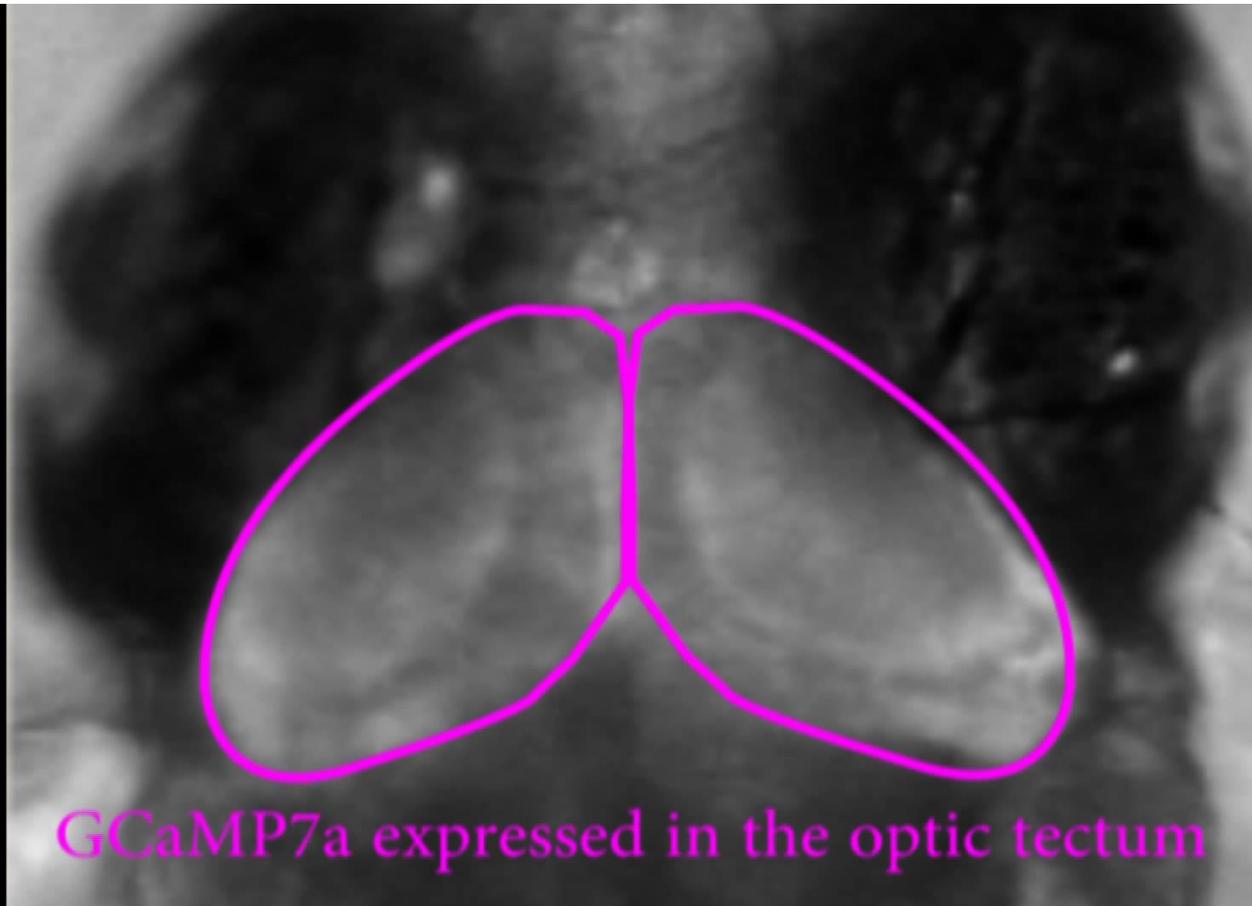
# VR1 рецептор-опосредованные сигналы в нейронах гипо- и гипер-алгезических диабетических крыс





# 3D реконструкция нейрональной активности всего мозга личинки zebrafish





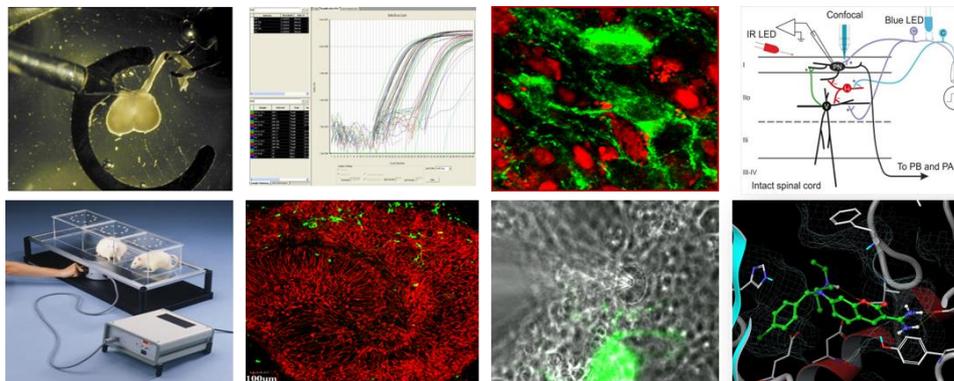
GCaMP7a expressed in the optic tectum

# Take Home Message

- *Кальциевая сигнализация объединяет мембранную возбудимость и биологическую функцию клетки. Из-за чрезвычайной чувствительности живой клетки к изменению внутриклеточной концентрации ионов кальция, даже относительно небольшие отклонения в кальциевой сигнализации могут привести к разрушительным последствиям.*
- *Нарушения внутриклеточной кальциевой сигнализации можно рассматривать как один из общих механизмов изменения передачи сигналов при различных патологиях.*

# Цікаво? Йди до КАУ!

## Кафедра молекулярної фізіології та біофізики



Професори кафедри



Магістратура та аспірантура – Вступ у ЧЕРВНІ 2018

# Спасибо за внимание!

