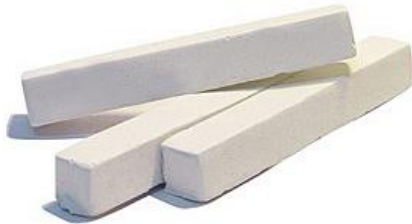




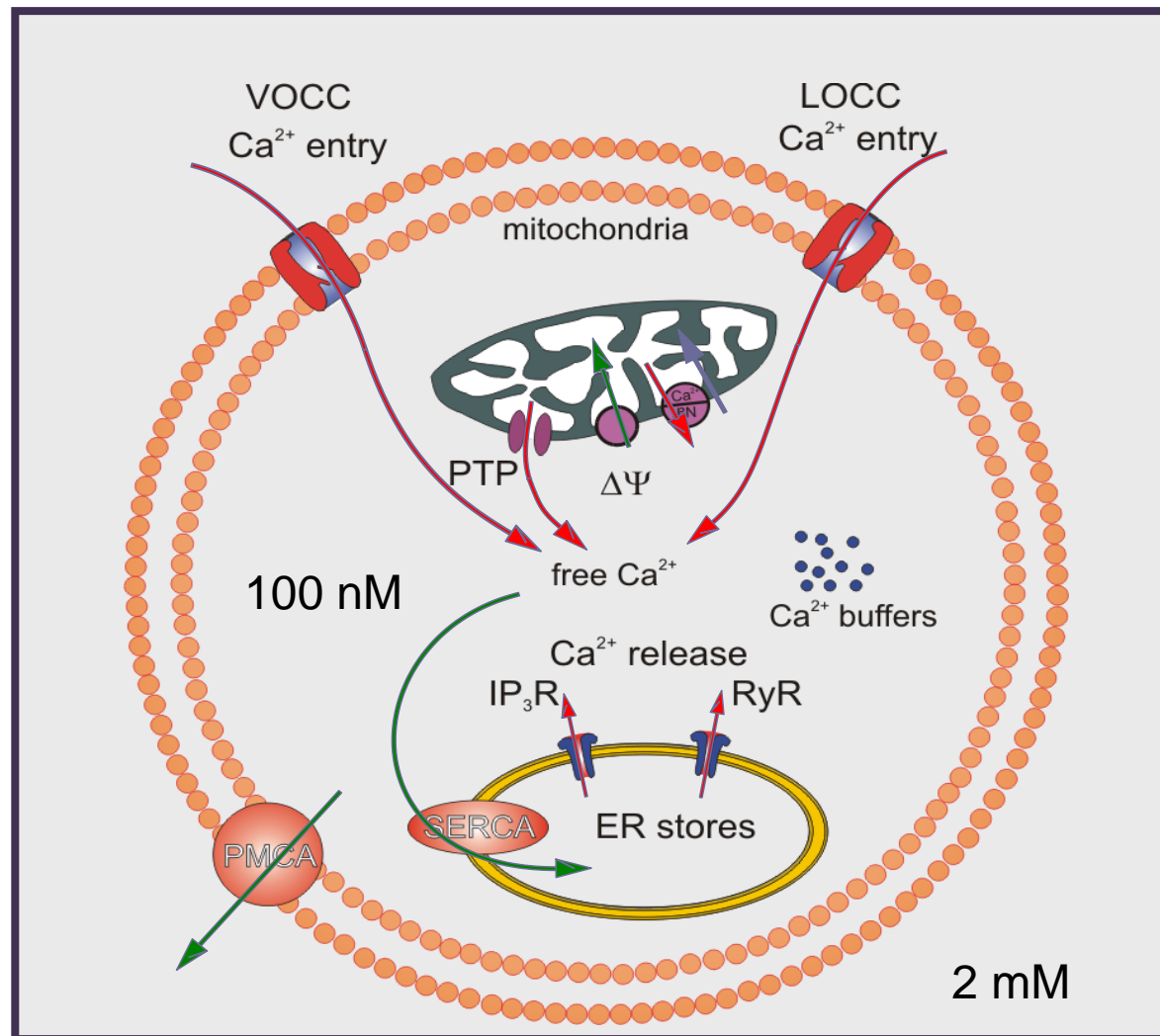
**Нана Владимировна  
Войтенко**

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

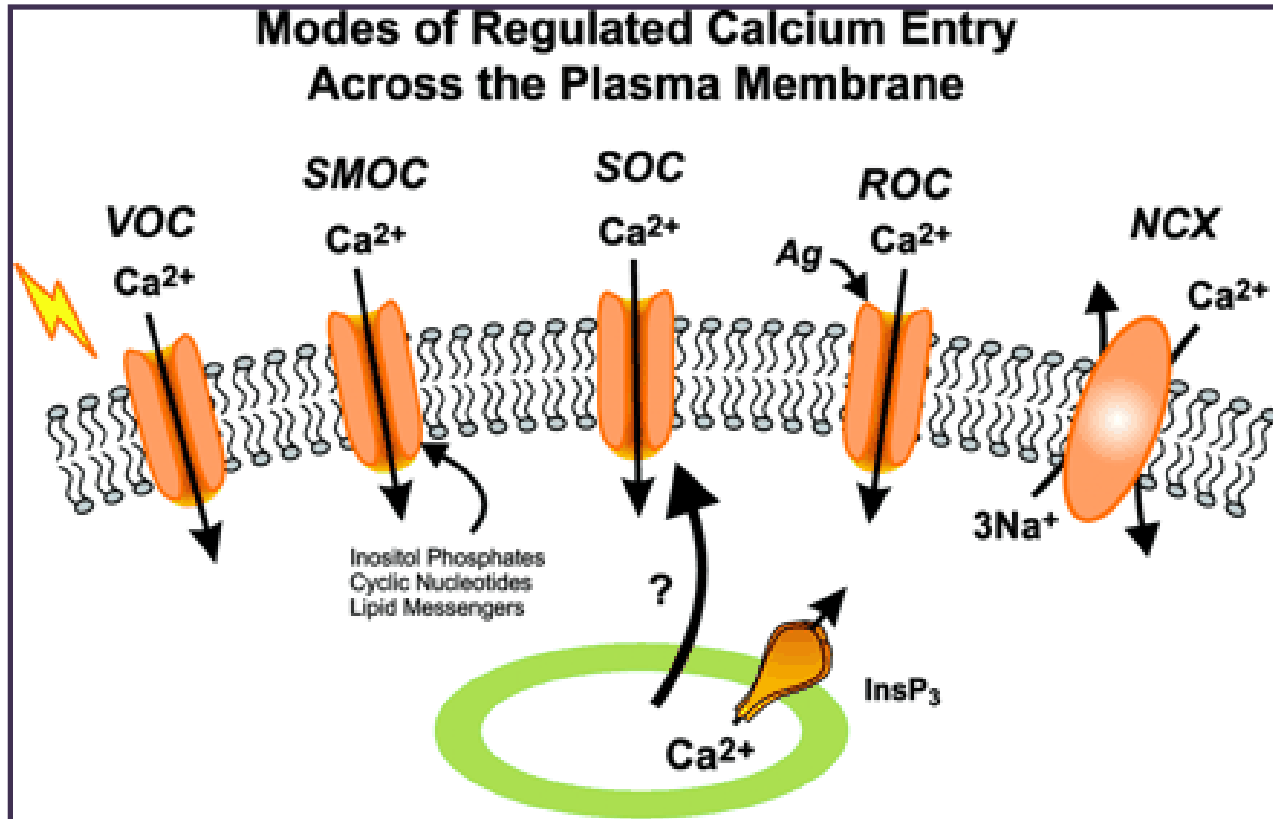
**Киев 2016**



# Механизмы кальциевой регуляции в нервной клетке



# Кальцивые каналы







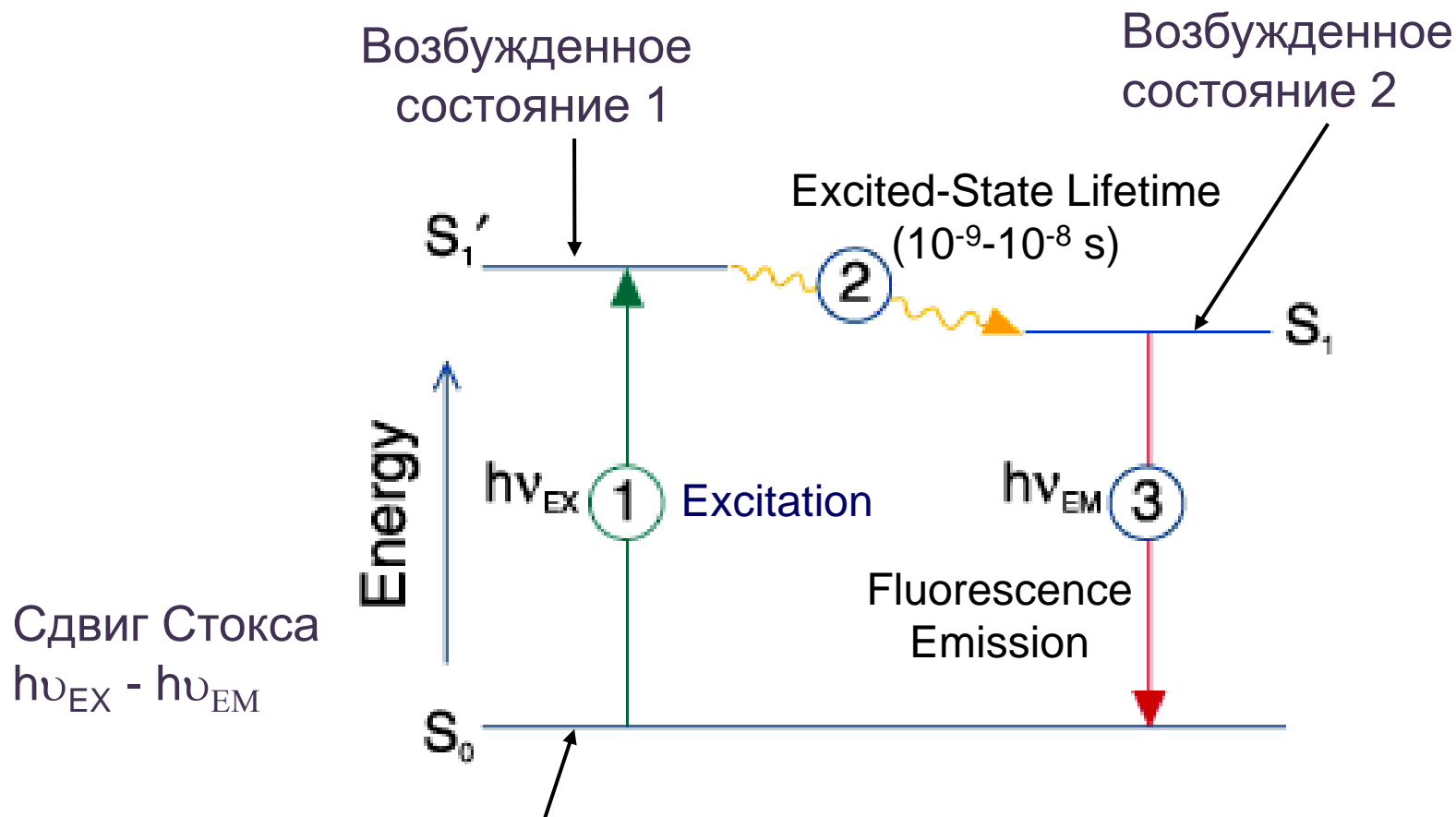
# **ВАЖНО**

- **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

# Флуоресцентные зонды Ультрафиолетовое возбуждение

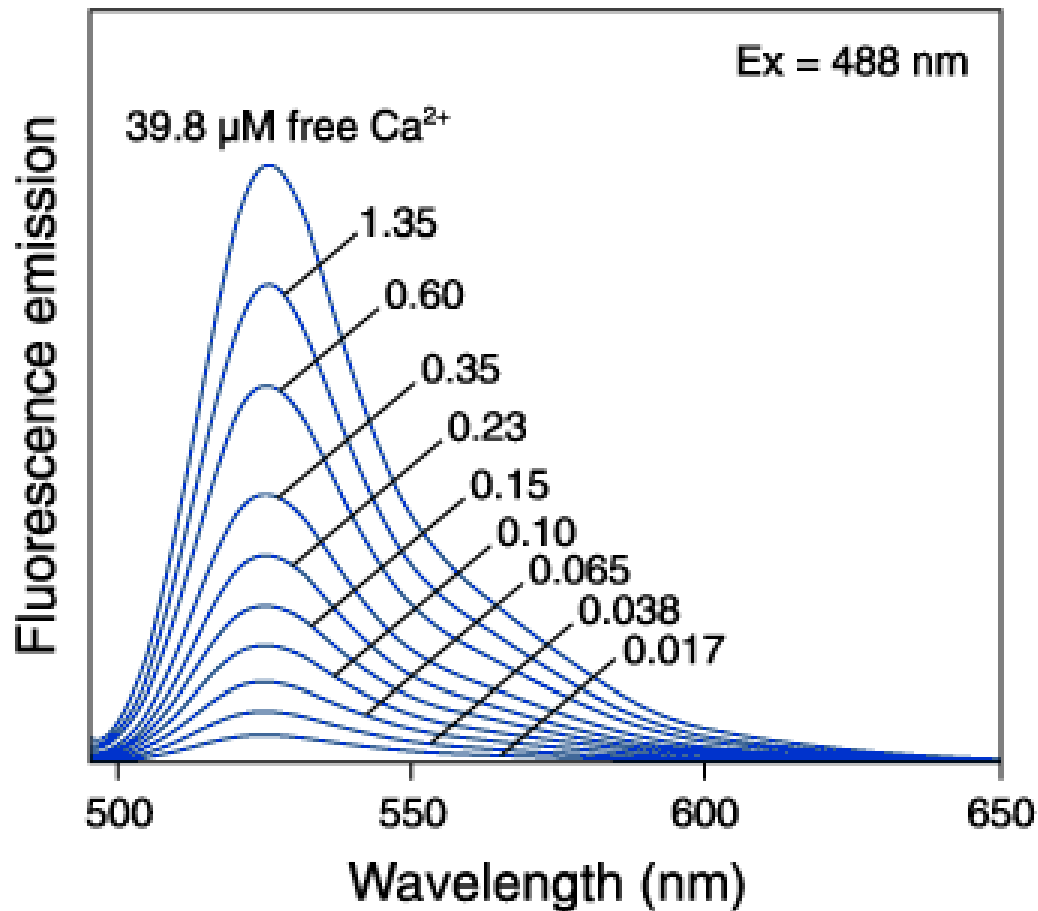
- **Высокоафинные индикаторы**
  - Quin-2 и его производные
- **Среднеафинные индикаторы**
  - Fura-4F, Fura-5F и Fura-6F
  - Benzothiaza-1 и 2
- **Низкоафинные индикаторы**
  - Fura-FF, BTC, Mag-Fura-2, Mag-Fura-5 и Mag-Indo-1

# **Флуоресцентные зонды**

## **Возбуждение видимым светом**

- **Высокоафинные индикаторы**
  - Fluo-4, Rhod-2 и их производные
  - Calcium Green, Calcium Orange, Calcium Crimson
  - Oregon Green 488 BAPTA индикаторы
  - Fura Red
- **Низкоафинные индикаторы**
  - Fluo-5N, Rhod-5N, X-Rhod-5N и их производные

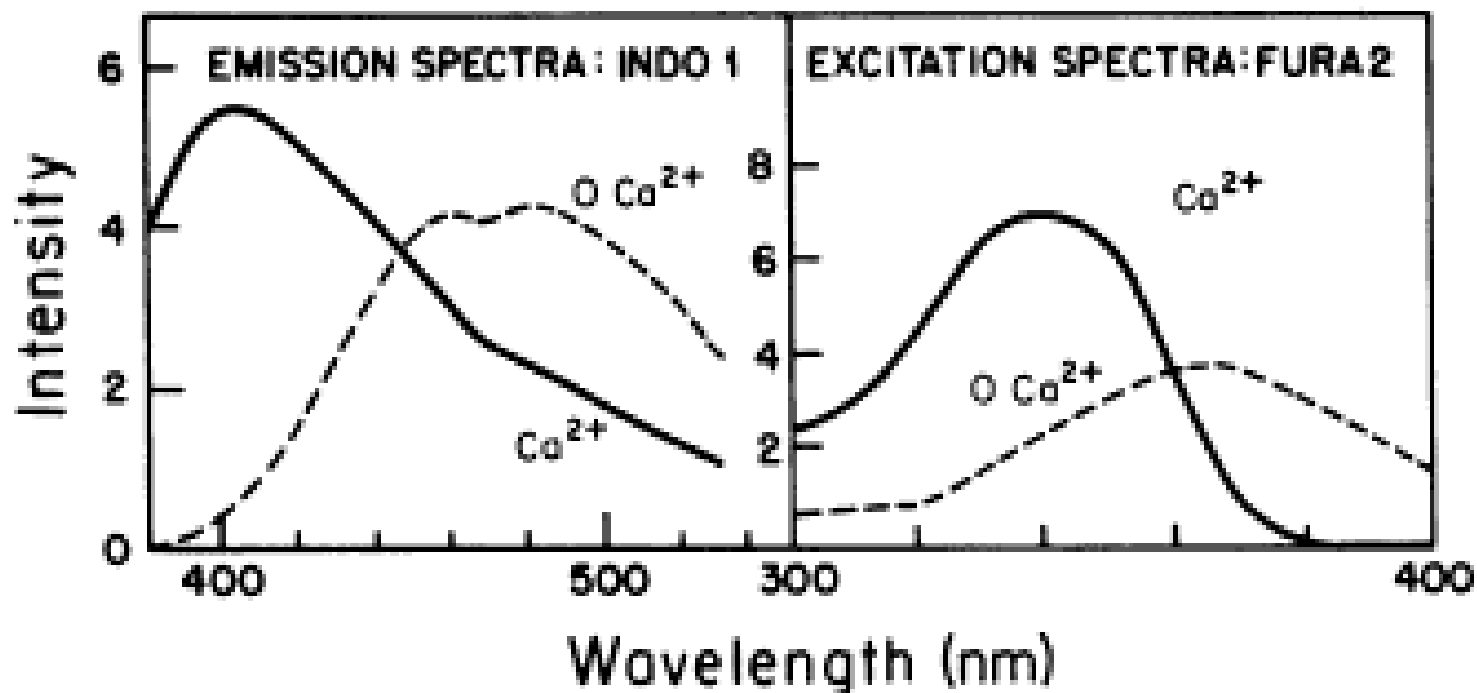
# Ca<sup>2+</sup>-зависимый спектр флуоресцентного излучения Fluo-3



# Двухволновые флуоресцентные зонды

## Ультрафиолетовое возбуждение

Fura-2, Indo-1 и их производные

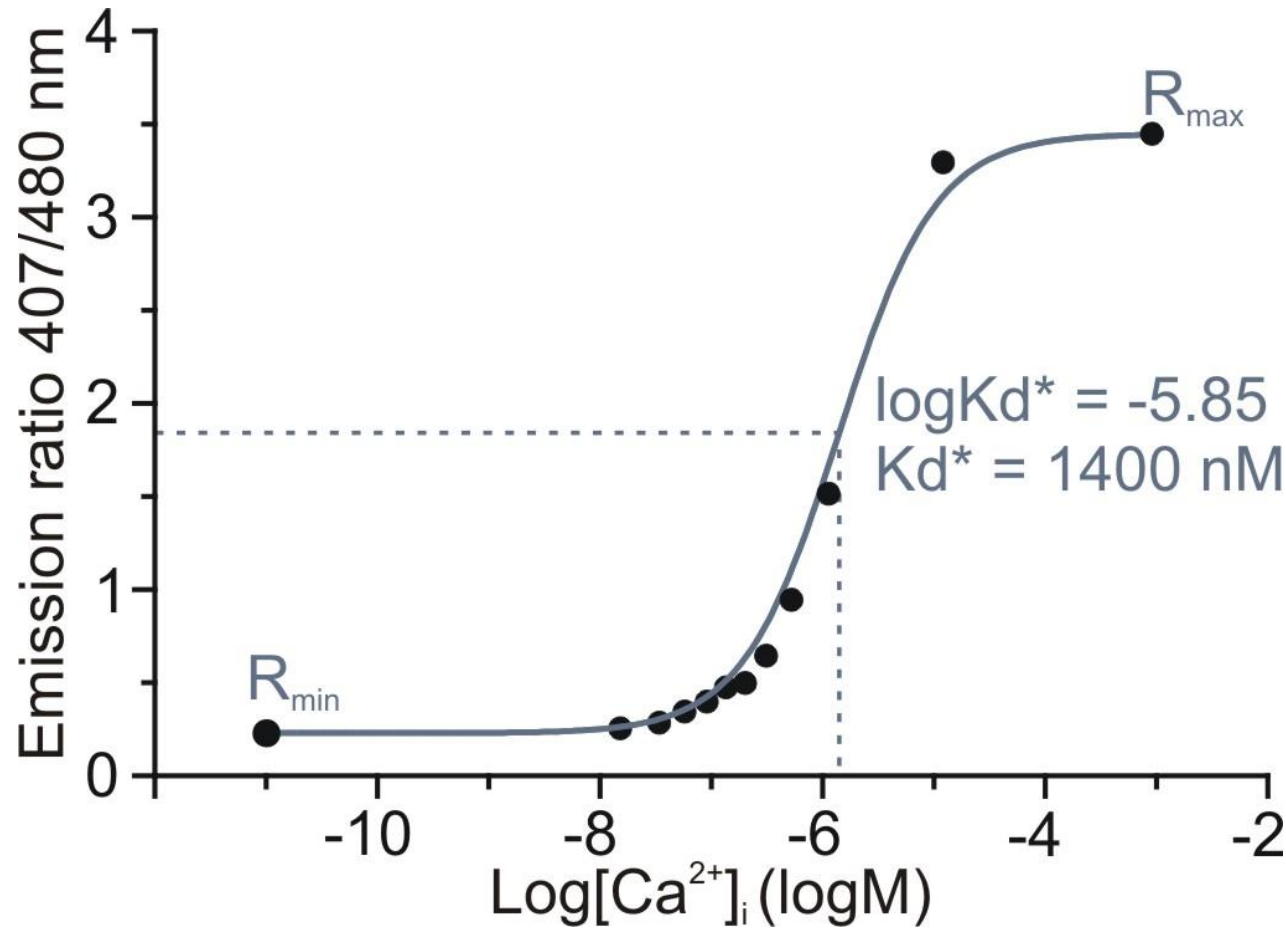


# Grynkiewicz equation

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

где R - is the measured two-wavelengths fluorescence ratio,  $R_{min}$  is the ratio at zero  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $R_{max}$  is the ratio for a saturating  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $Kd^*$  represents the *apparent* dissociation constant for  $Ca^{2+}$  binding to the dye. To be able to estimate  $[Ca^{2+}]_i$ , the free  $[Ca^{2+}]_i$  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  $Kd^*$  parameters.

# Калибровка

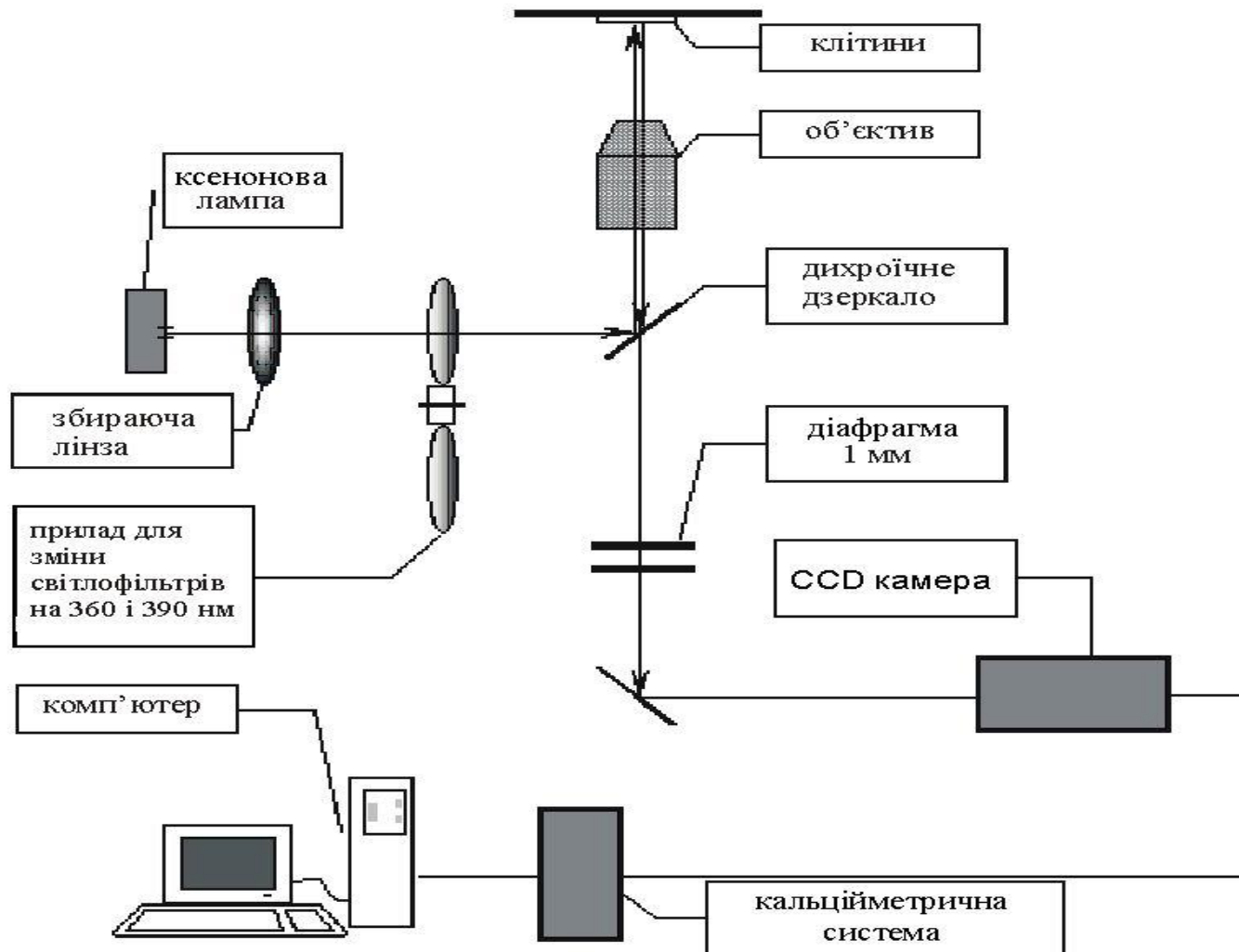


Calibration curve for the determination of the free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) using the indo-1 fluorescence ratio. The parameters  $R_{min}$ ,  $R_{max}$ , and  $K_d^*$  were determined by fitting the following curve to the data points:

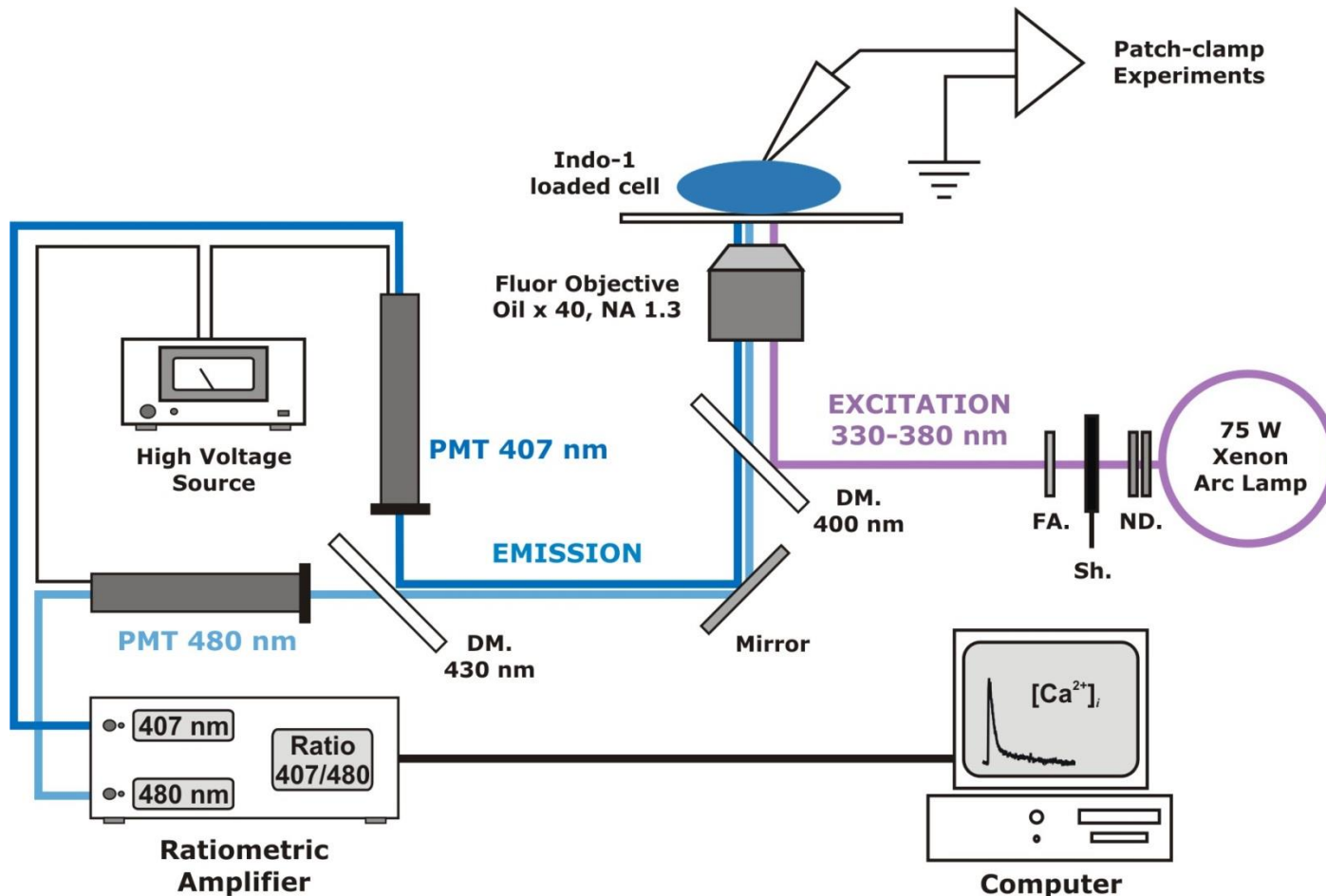
$$R = \left[ \frac{R_{min} - R_{max}}{1 + \left( \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i}{K_d^*} \right)^n} \right] + R_{ma.}$$

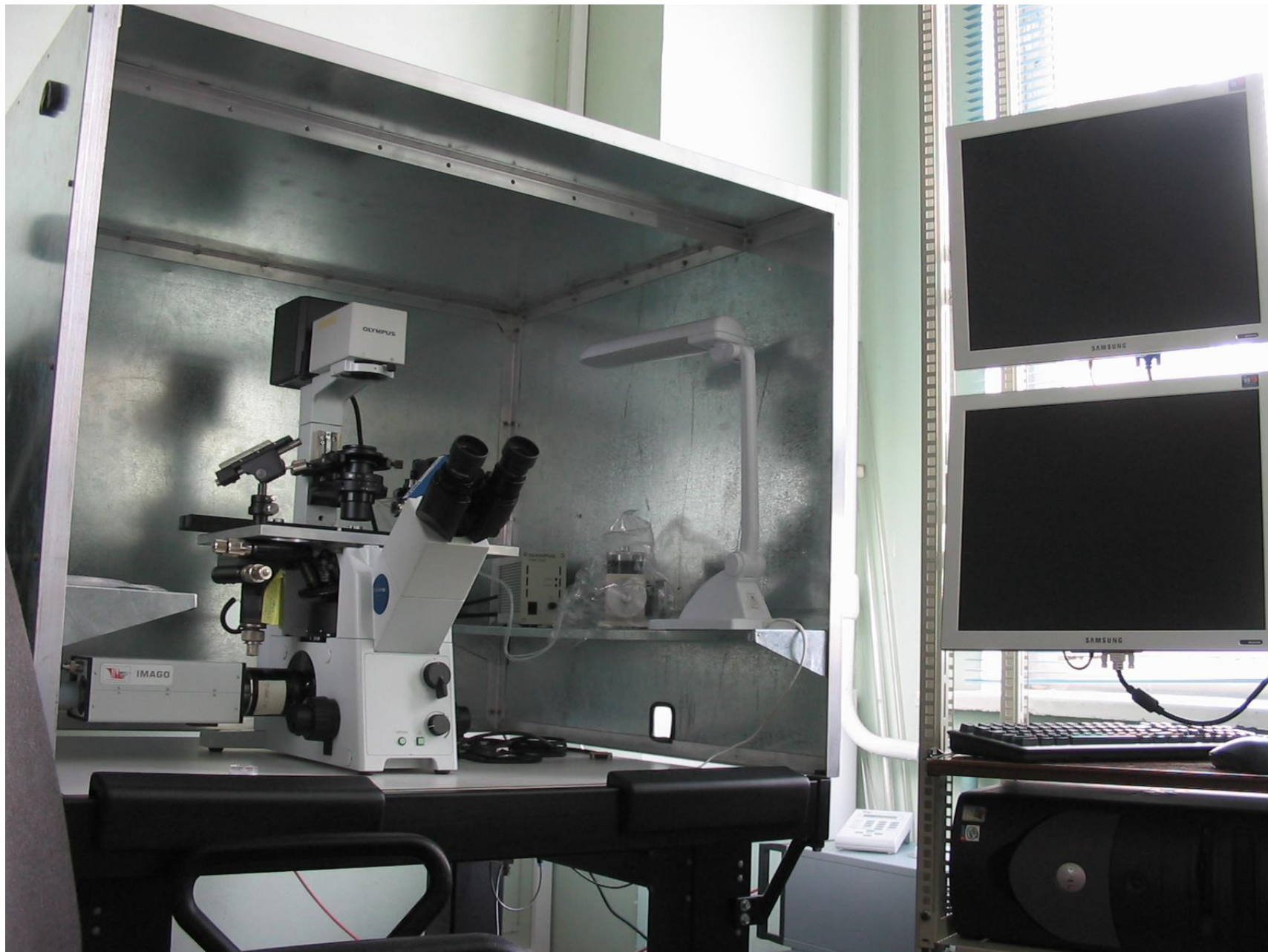


# Експериментальна установка для визуалізації кальція с помощью красителя fura-2



# Экспериментальная установка для визуализации кальция с помощью красителя indo-1

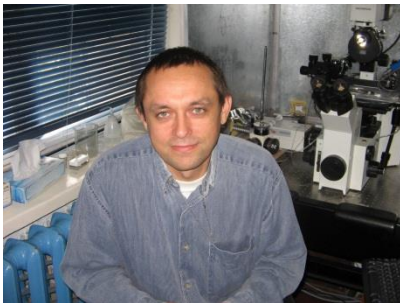




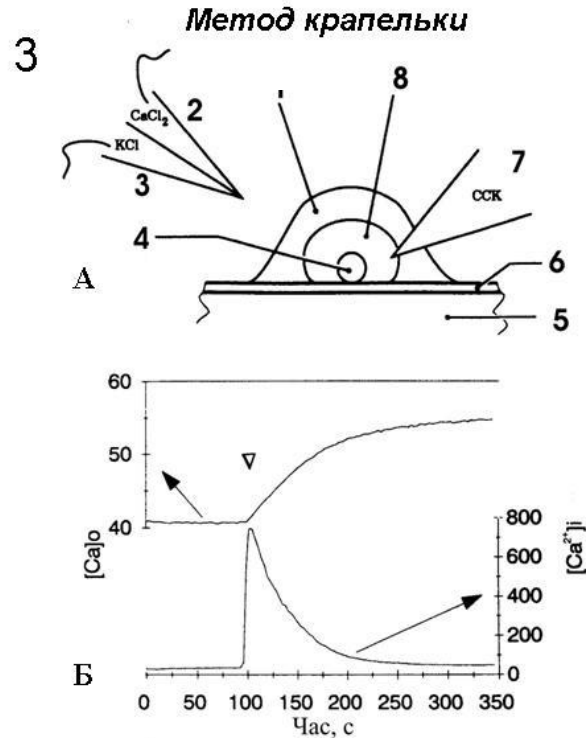
# Метод капельки



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.

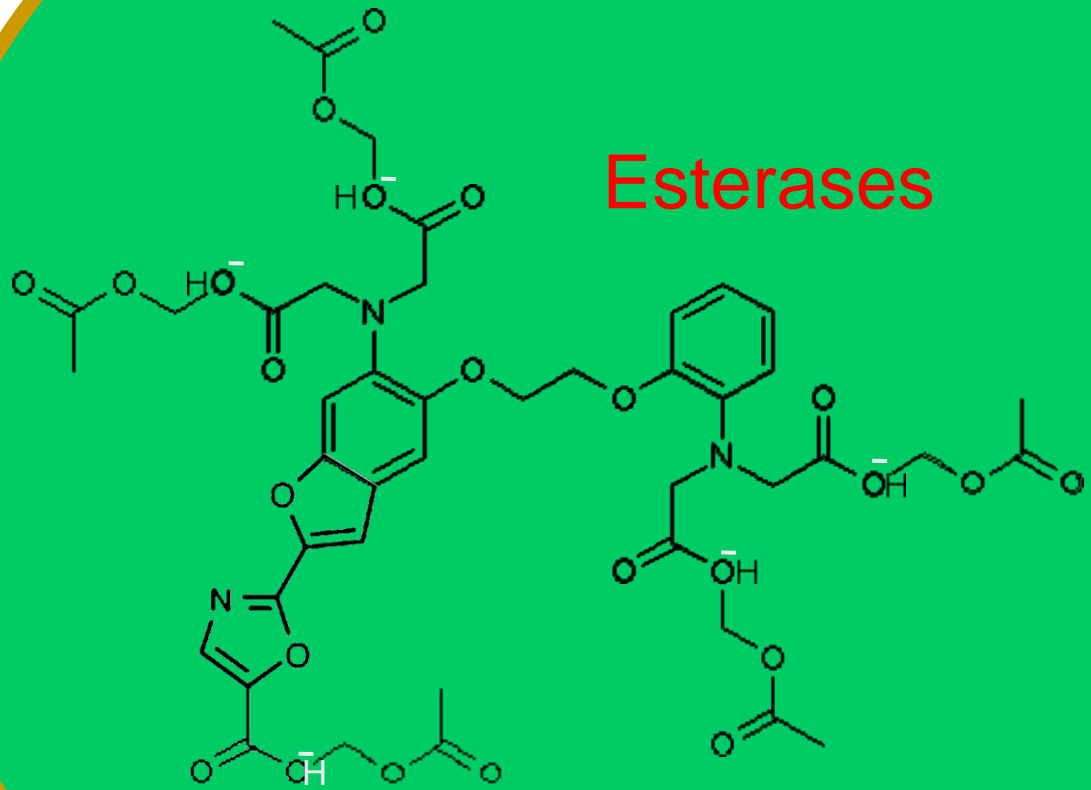
**Б.** Приклад вимірювань у краплинці. Зміни концентрації вільного внутрішньоклітинного кальцію (нижня крива, права вісь, нМ) і загального зовнішньоклітинного кальцію ( $[Ca^{2+}]_o$ ) (верхня крива, ліва вісь, мМ) як результат стимуляції високою дозою ССК.

# Процедура загрузки зонда

- **Загрузка AM-форм (эфирных) красителя**
  - Derivatized with an AM (acetoxymethyl) ester
  - Passively diffuses through plasma membrane
  - Subject to compartmentalization or incomplete hydrolysis

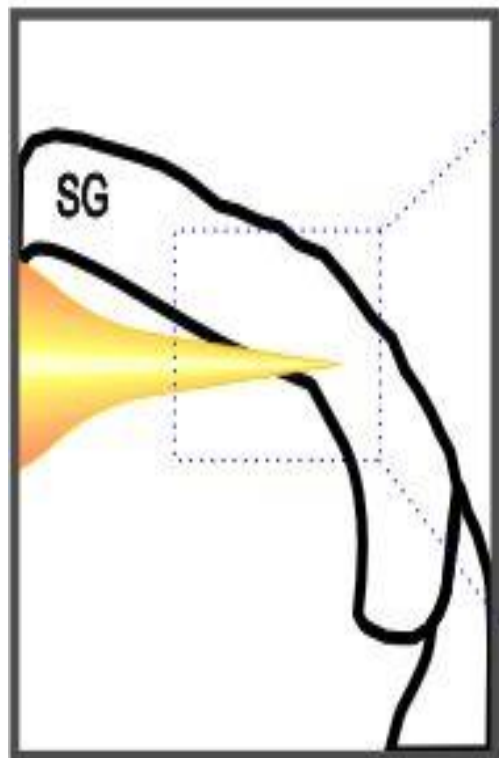
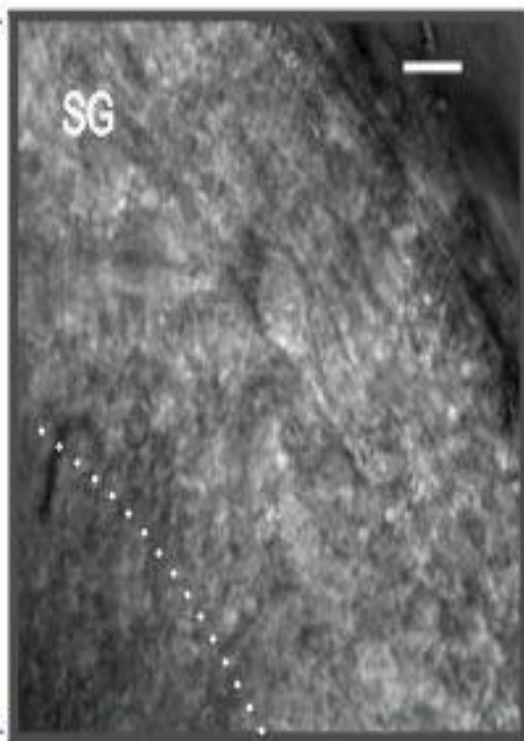
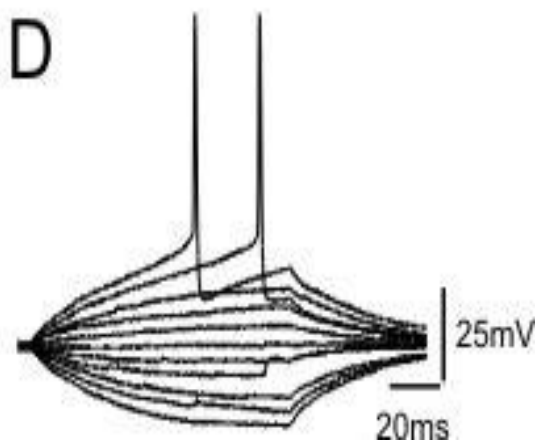
# Fura2 AM

Esterases



- **Микроинъекция**
  - Инъекция индикатора, растворенного во внутриклеточном растворе через стеклянный микроэлектрод под давлением или с помощью электрофореза
- **Загрузка через Patch-Clamp пипетку**
  - Пассивная диффузия и диализ внутриклеточного содержимого



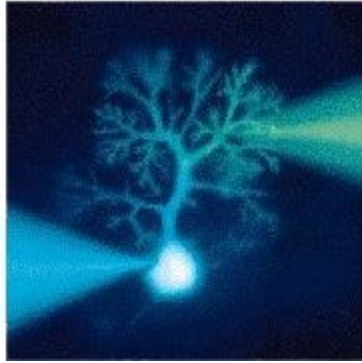
**A****B****C****D**



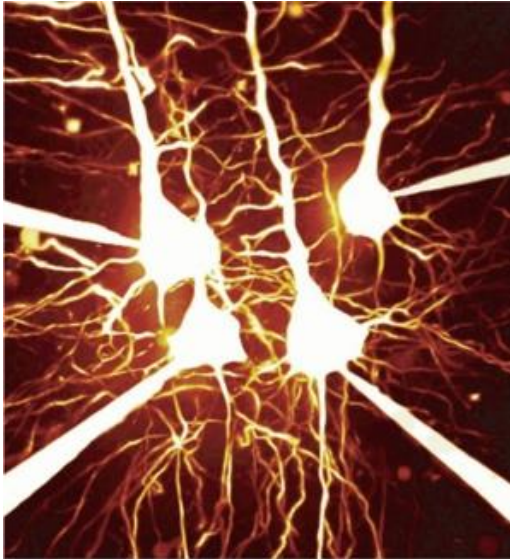
A



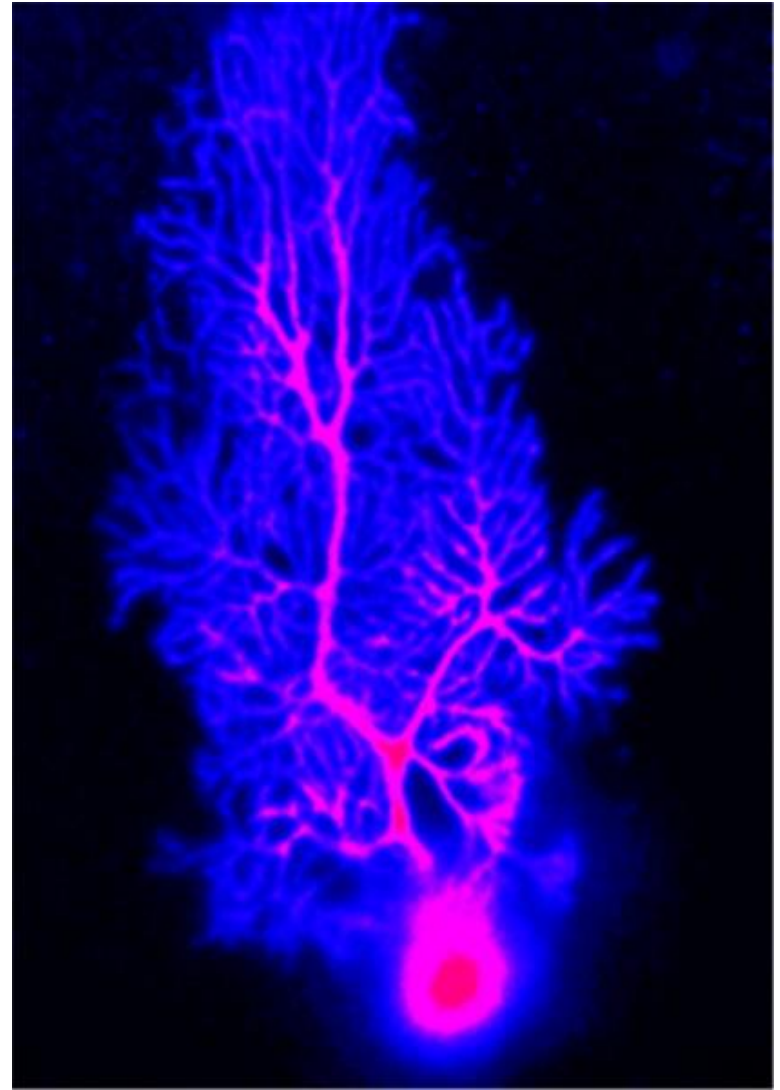
B



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

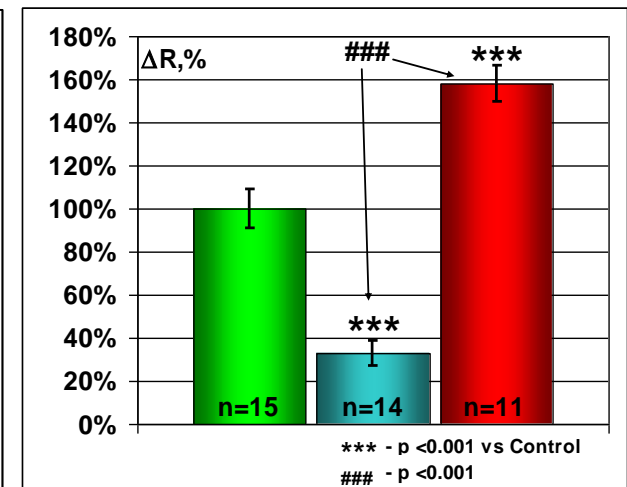
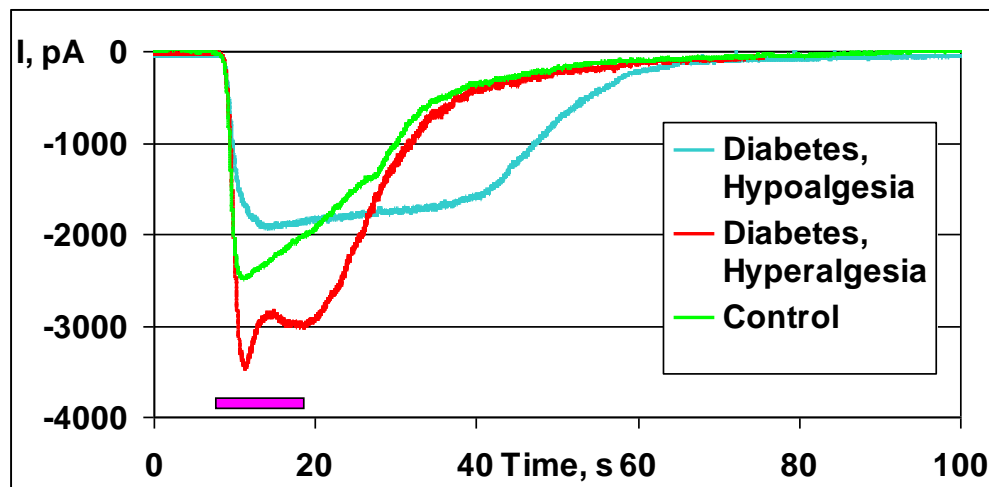
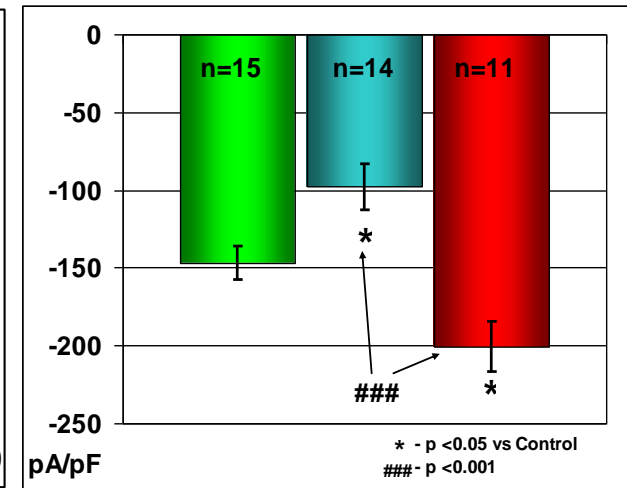
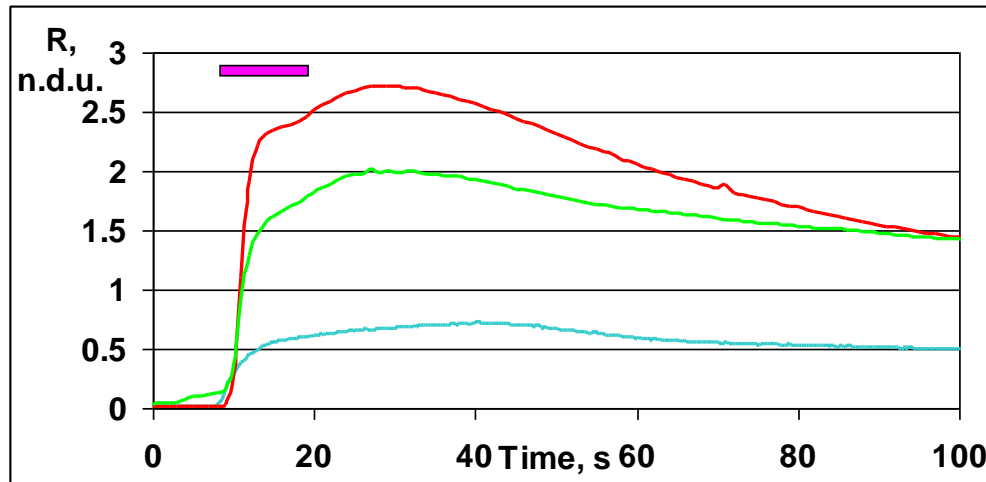


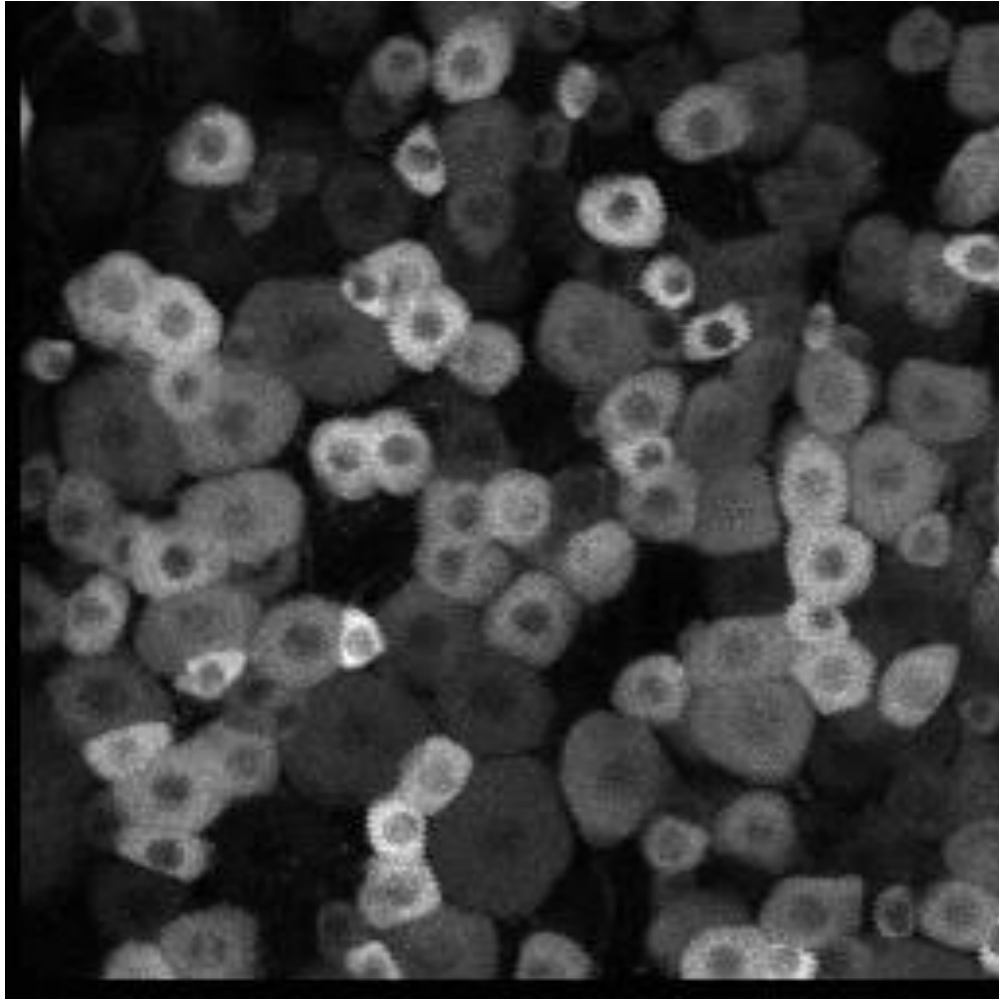
Simultaneous quadruple patch-clamp recording from layer 5 pyramidal neurons in a cortical brain slice. Neurons were filled with a fluorescent calcium indicator and imaged with 2-photon laser-scanning microscopy.



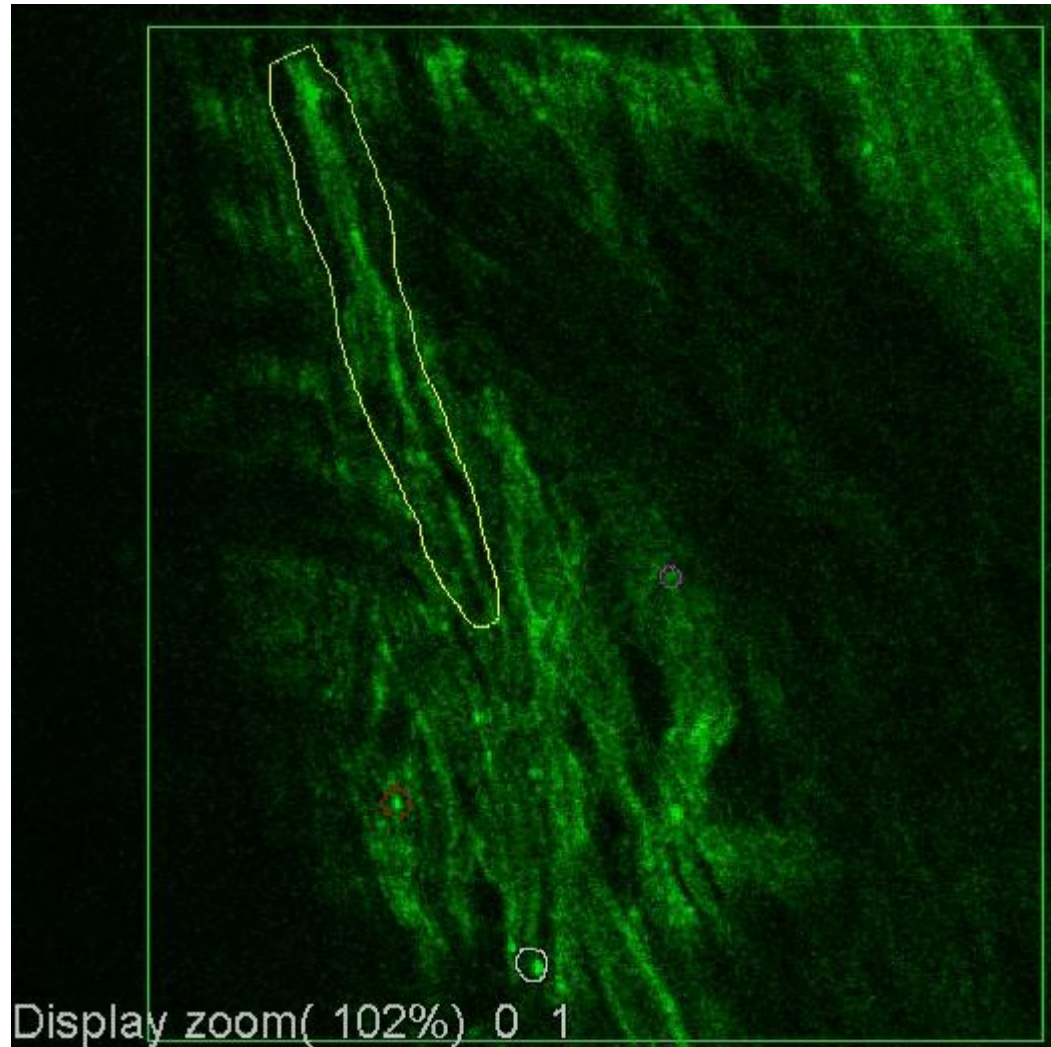
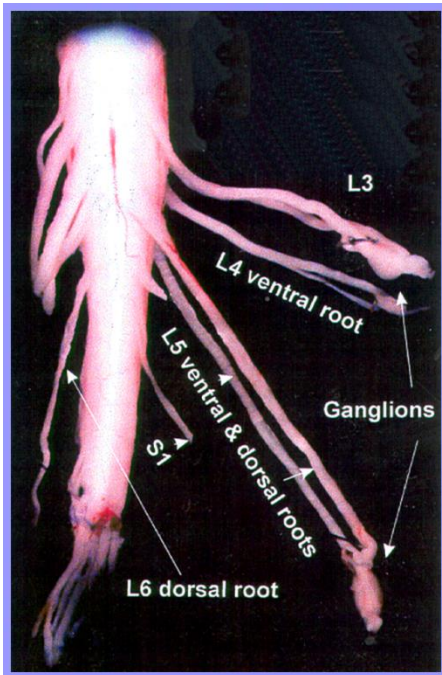
Hot calcium in a Purkinje neuron.

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



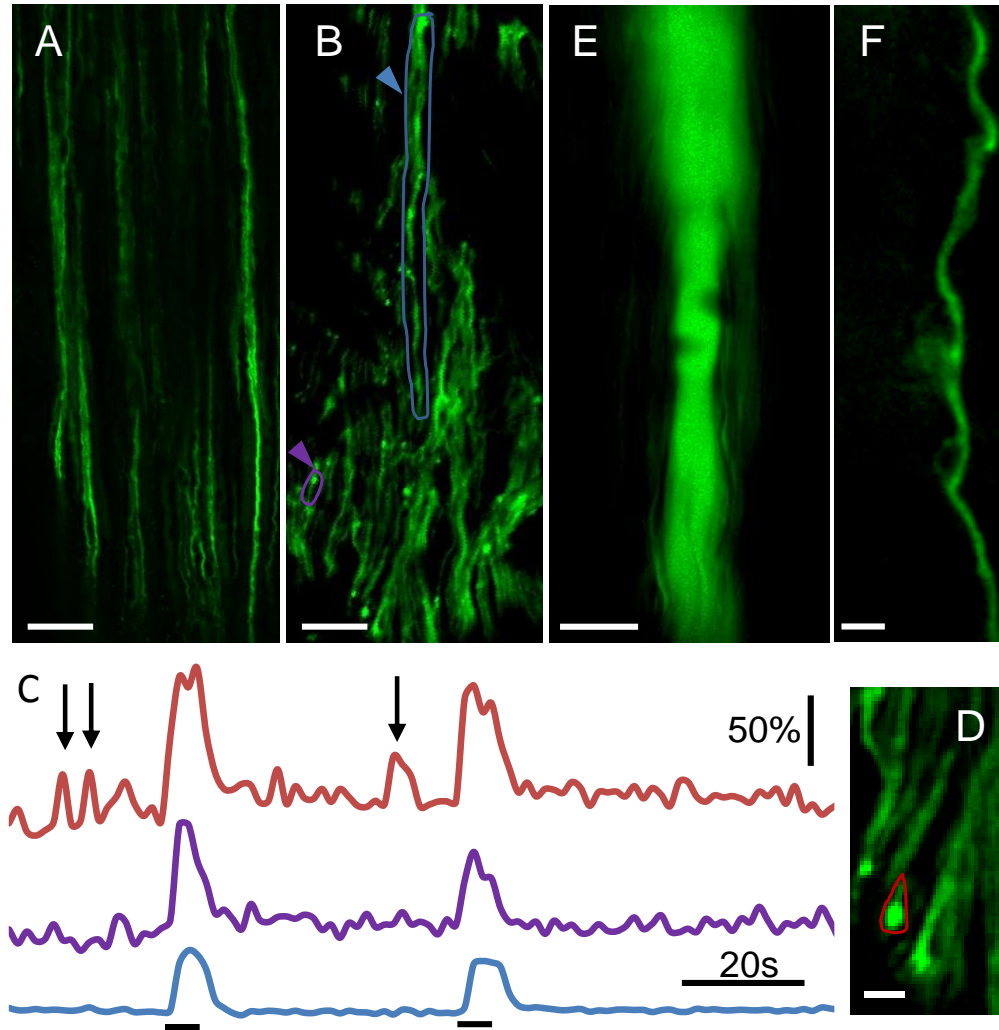


# Ca<sup>2+</sup> imaging in central axons of DRG neurons in PIRT-GCamp3 mice

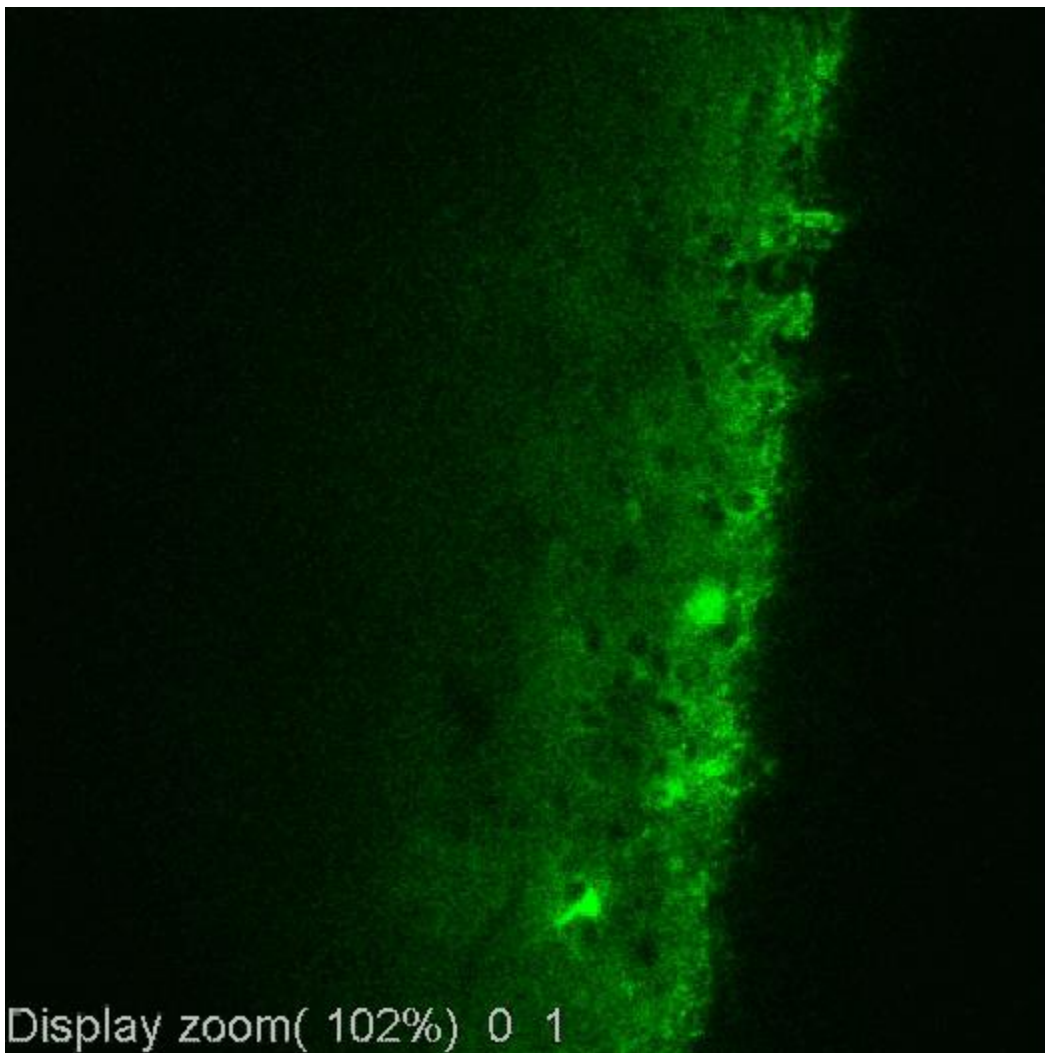




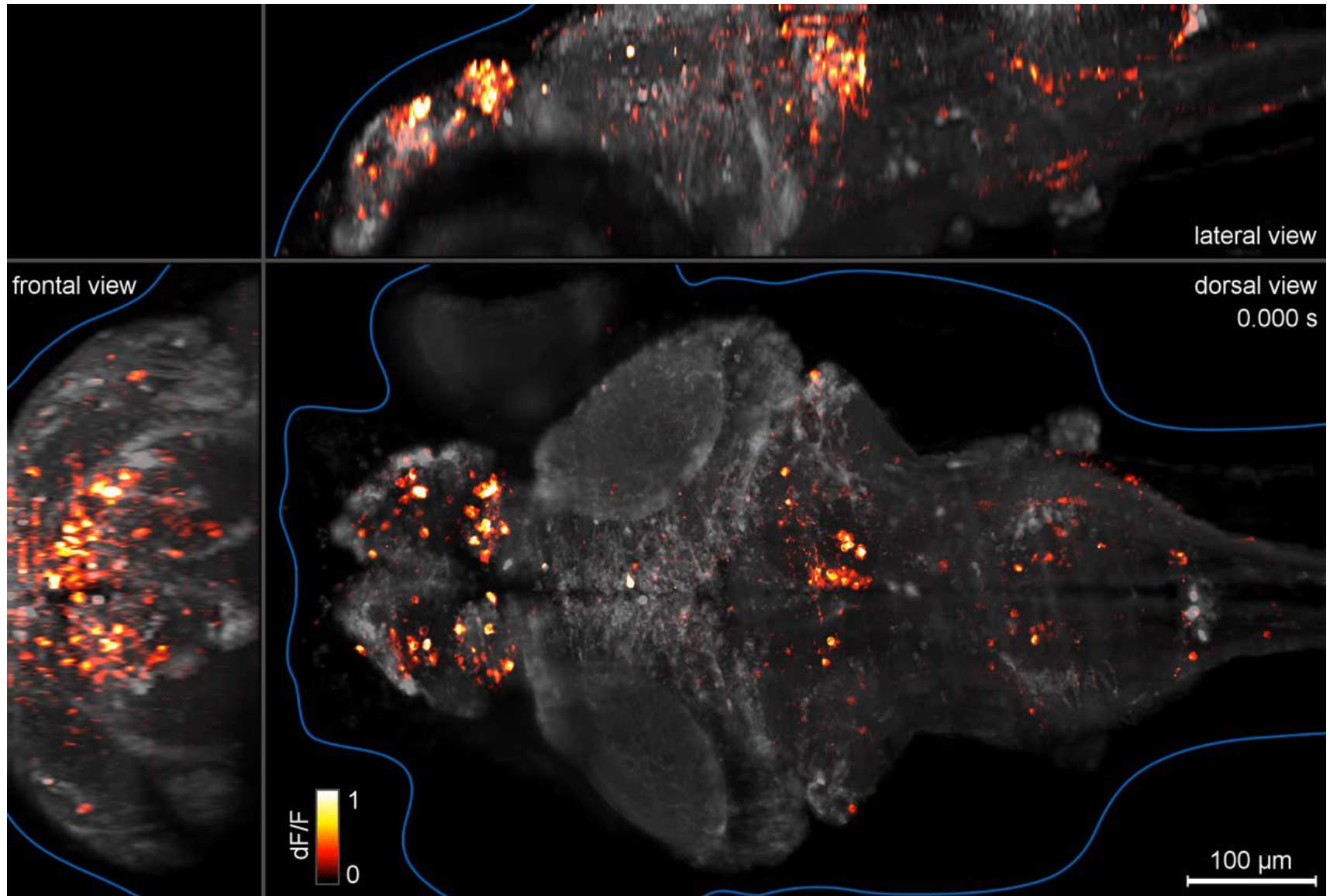
# Ca<sup>2+</sup> imaging in central axons of DRG neurons in PIRT-GCamp3 mice



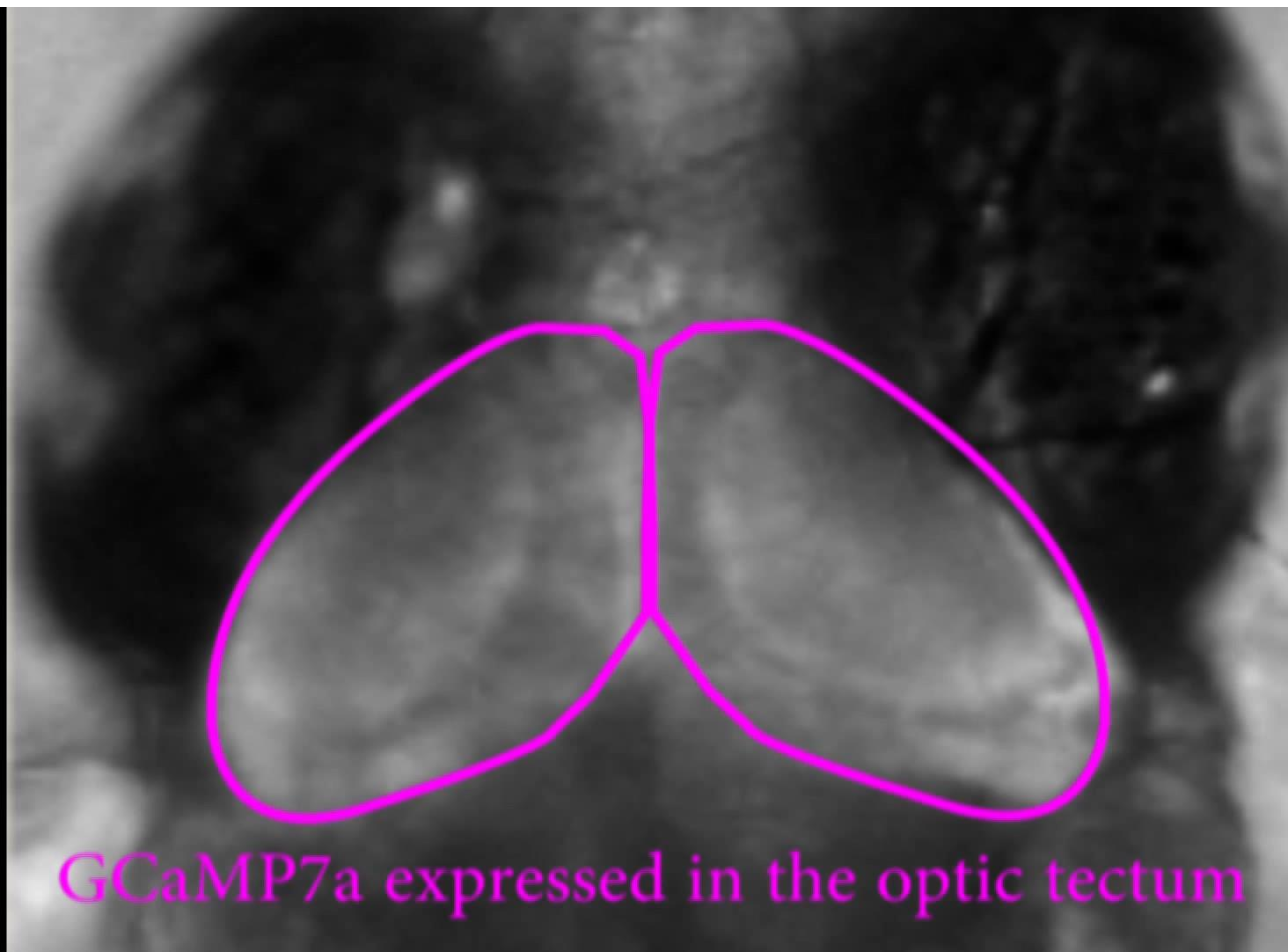
# Ca<sup>2+</sup> imaging in intact spinal cord of NESTIN-GCAMP3 mice



# 3D реконструкция нейрональной активности всего мозга личинки zebrafish



# Визуализация активности нейронов личинки zebrafish





# 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.*

# Спасибо за внимание!

