

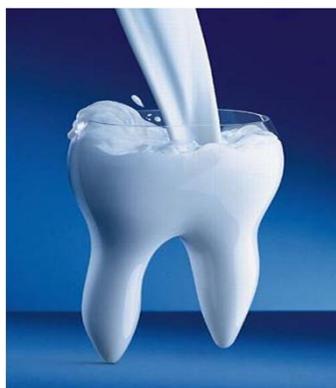
**Институт физиологии им. А.А.  
Богомольца НАН Украины**



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

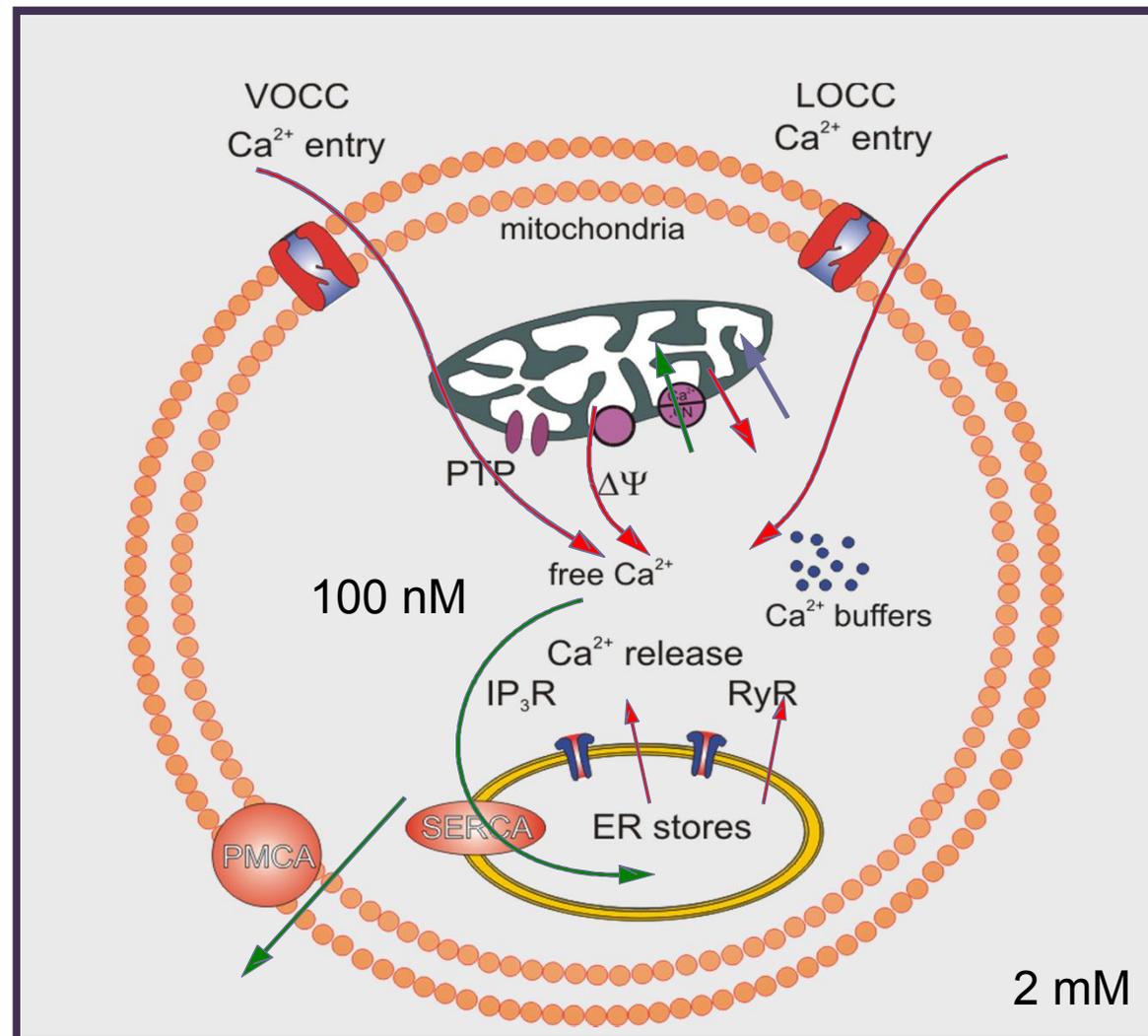
**д.б.н. Нана Владимировна Войтенко**

**8-я Школа-семинар  
«Биофизические методы исследований»  
14-16 мая  
Киев - 2014**

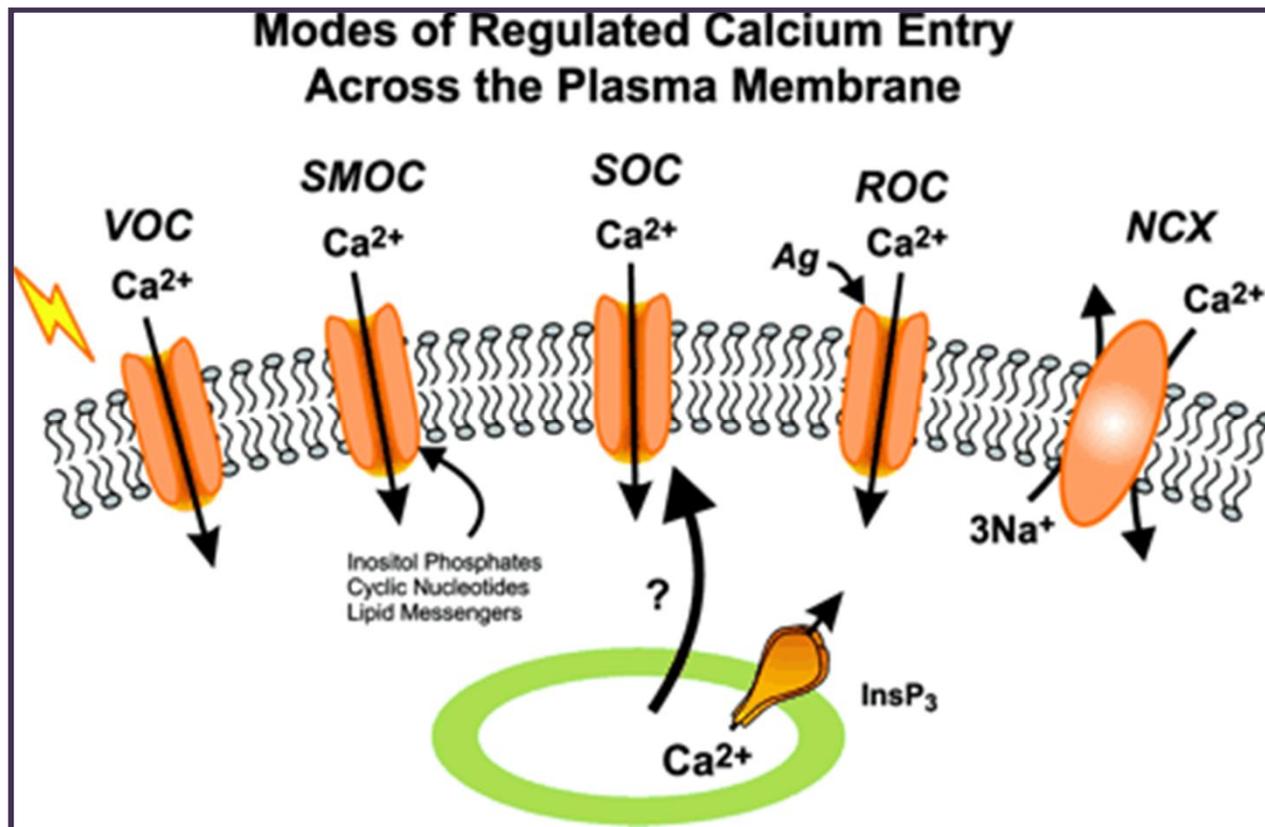


- Ионы кальция относятся к наиболее распространенным ионам в организме. В клетке большая их часть находится в связанном с цитоплазматическими белками состоянии или в клеточных органеллах, в том числе в эндоплазматическом ретикулуме, ядре, митохондриях и лизосомах. Лишь небольшая часть кальция находится в ионизированном виде, но именно она обладает функцией универсального вторичного посредника и играет главную роль во внутриклеточной регуляции.
- В нервных клетках роль ионов кальция в первую очередь связывают с регуляцией возбудимости, освобождением медиаторов и долгосрочными изменениями эффективности синаптической передачи.
- Изменения некоторых аспектов регуляции цитозольного уровня  $[Ca^{2+}]_i$  может быть причиной нарушения проведения сигналов при различных физиологических и патофизиологических состояниях.

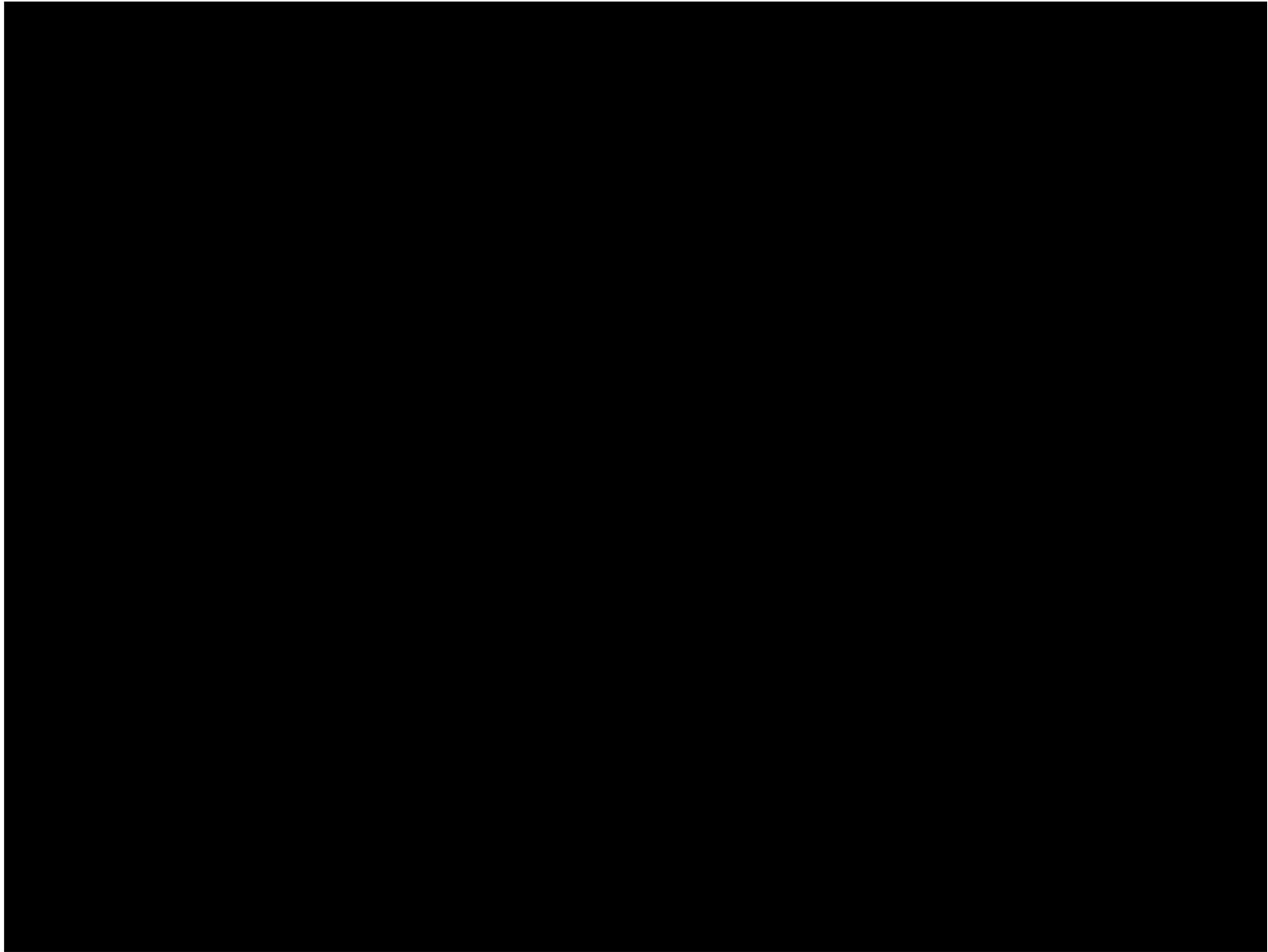
# Механизмы кальциевой регуляции в нервной клетке



# Кальцивые каналы





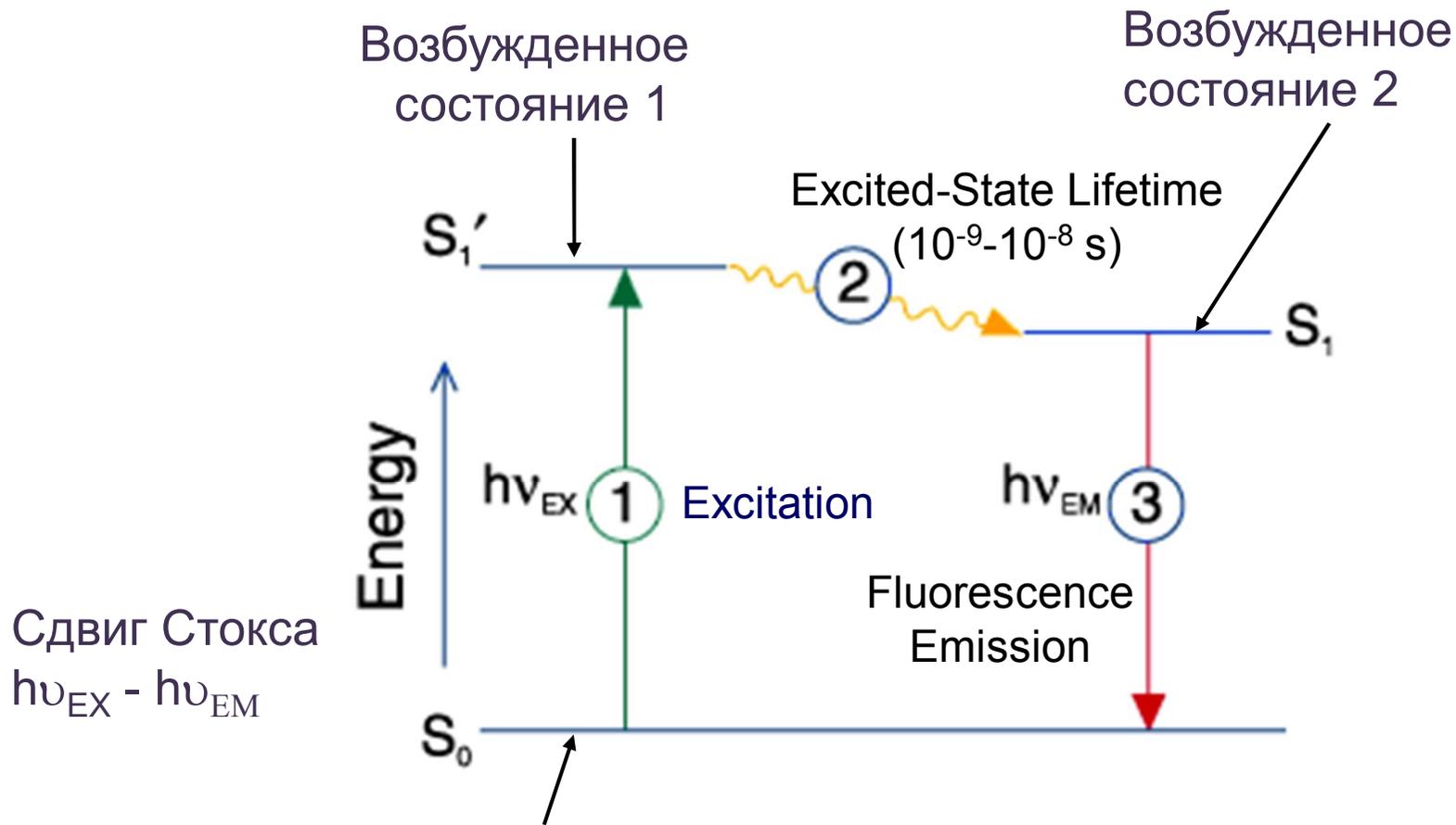


# **ВАЖНО**

- **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

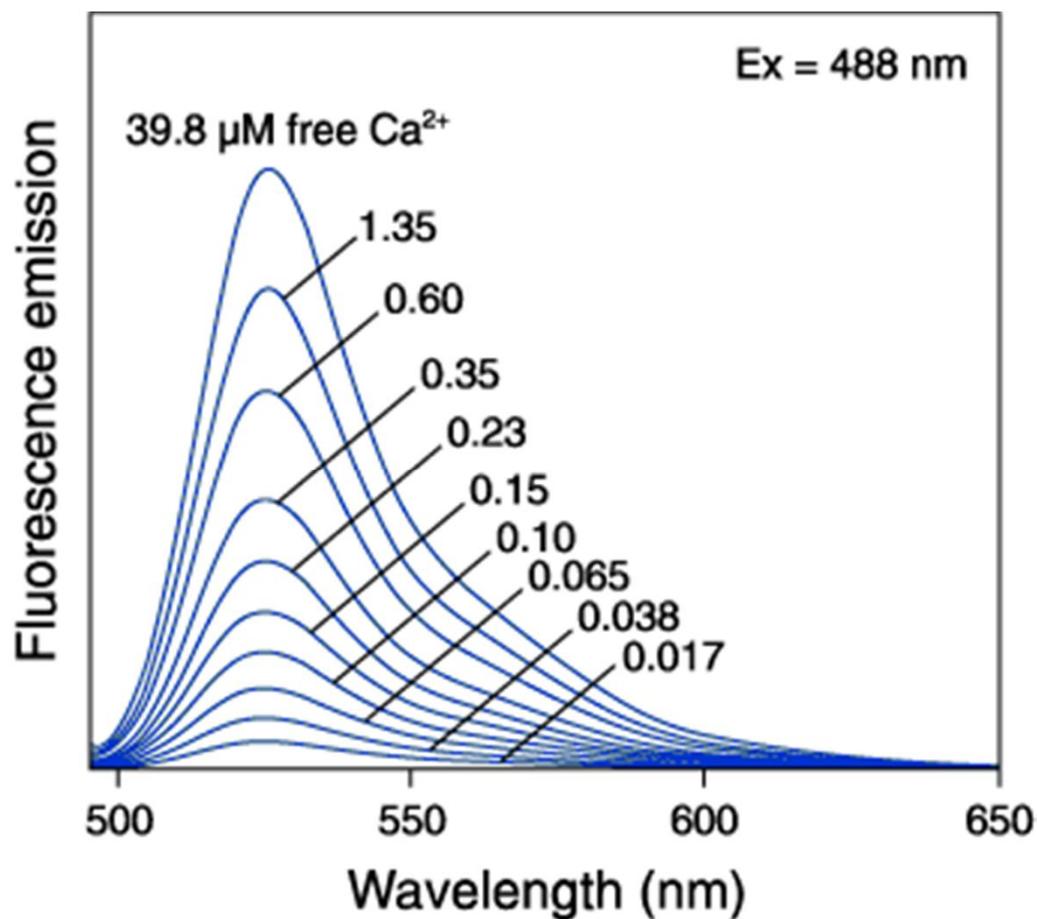
- **Высокоафинные индикаторы**
  - Quin-2 и его производные
- **Среднеафинные индикаторы**
  - Fura-4F, Fura-5F и Fura-6F
  - Benzothiaza-1 и 2
- **Низкоафинные индикаторы**
  - Fura-FF, BTC, Mag-Fura-2, Mag-Fura-5 и Mag-Indo-1

# **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

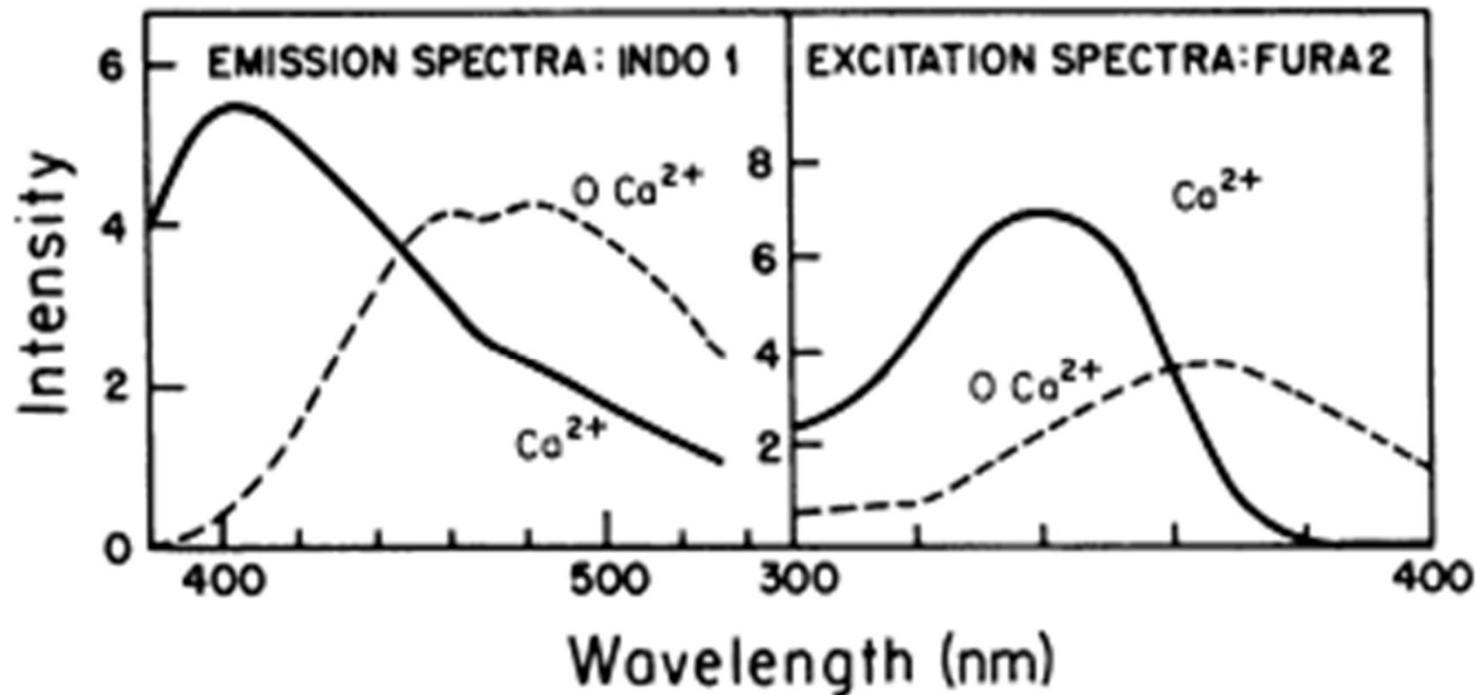
# Ca<sup>2+</sup>-зависимый спектр флуоресцентного излучения Fluo-3



# Двухволновые флуоресцентные зонды

## Ультрафиолетовое возбуждение

Fura-2, Indo-1 и их производные

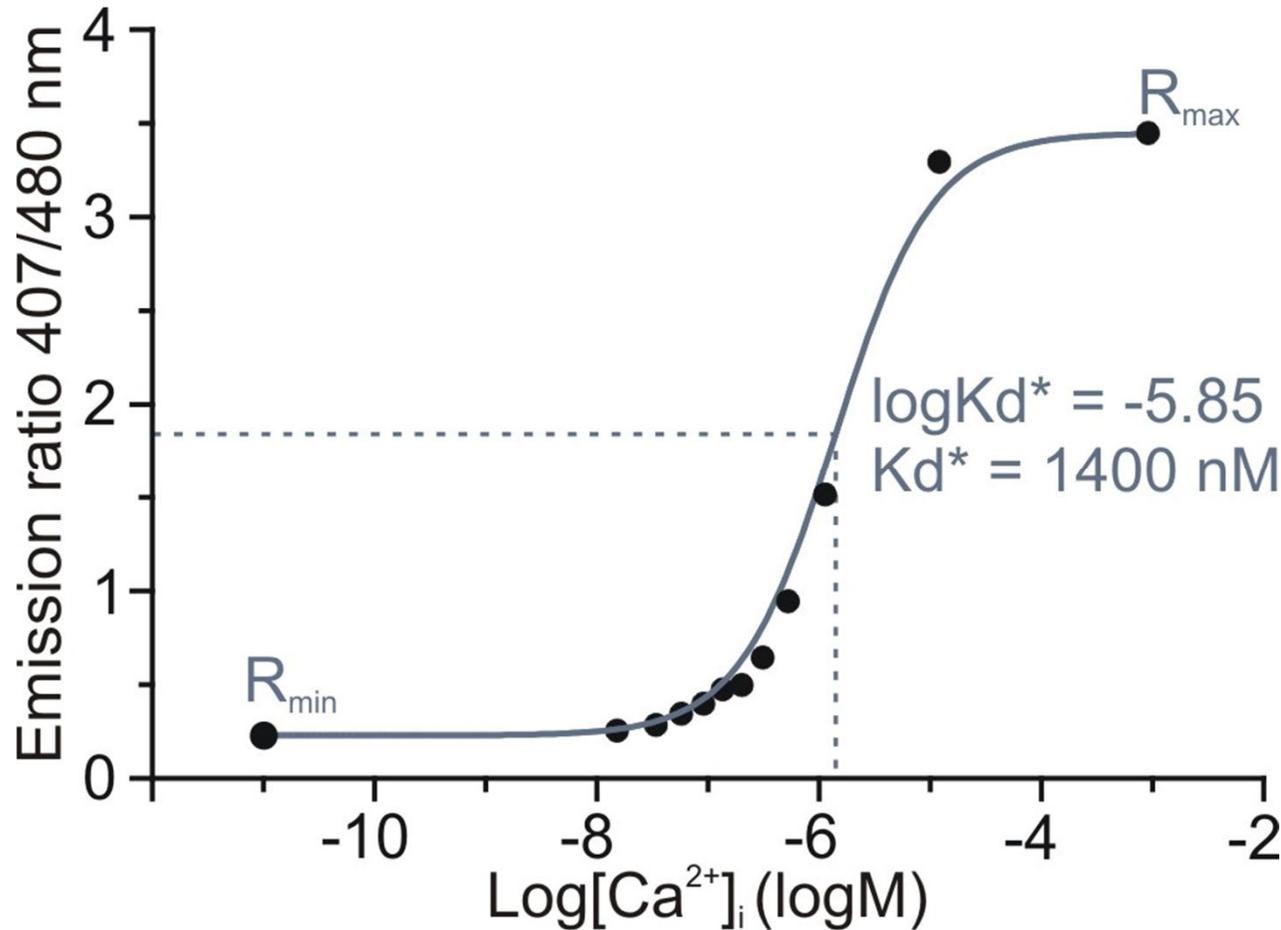


## Grynkiewicz equation

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

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

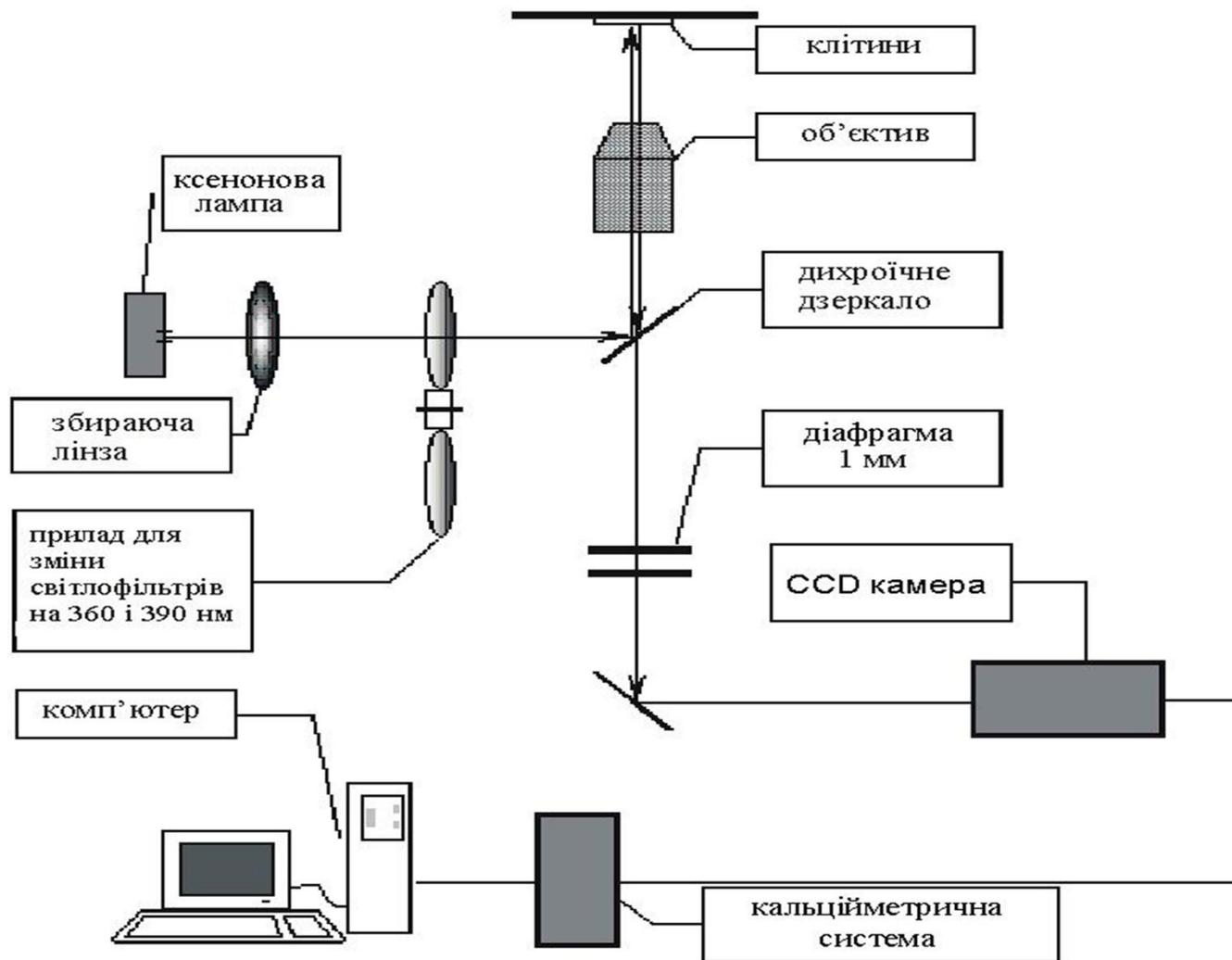
# Калибровка



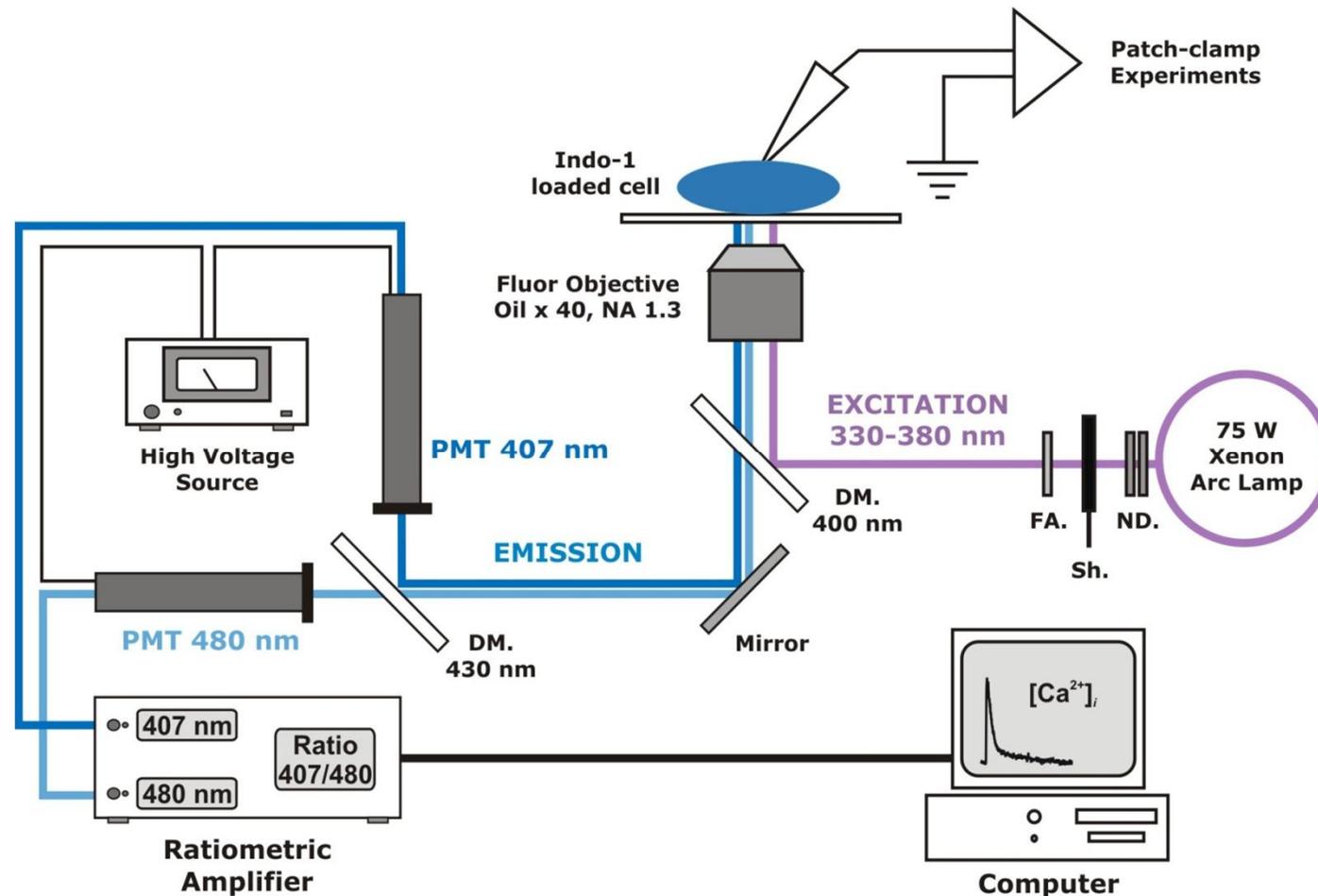
Calibration curve for the determination of the free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) using the indo-1 fluorescence ratio. The parameters  $R_{min}$ ,  $R_{max}$ , and  $K_d^*$  were determined by fitting the following curve to the data points:

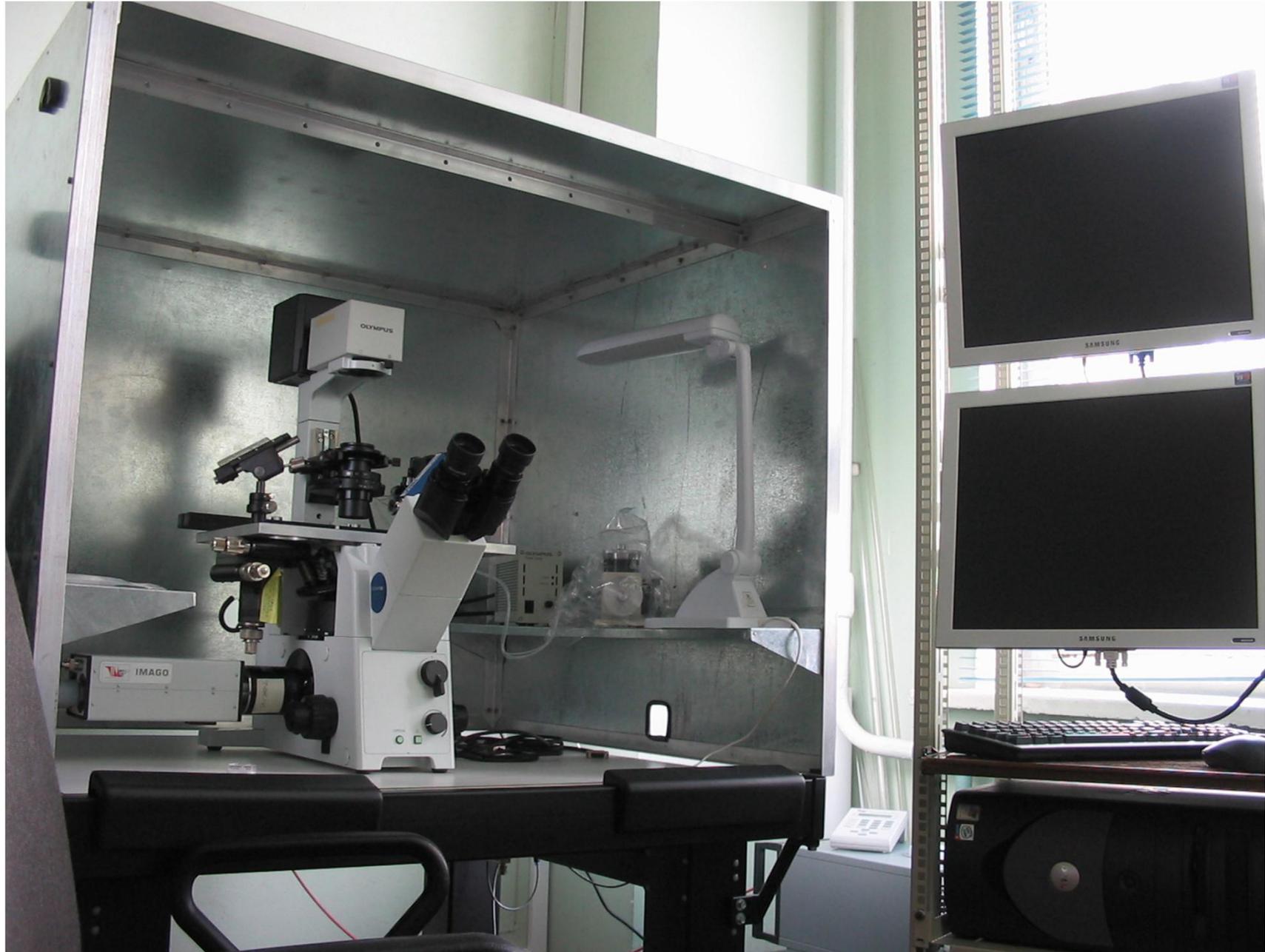
$$R = \left[ \frac{R_{min} - R_{max}}{1 + \left( \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i}{K_d^*} \right)^n} \right] + R_{max}$$

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

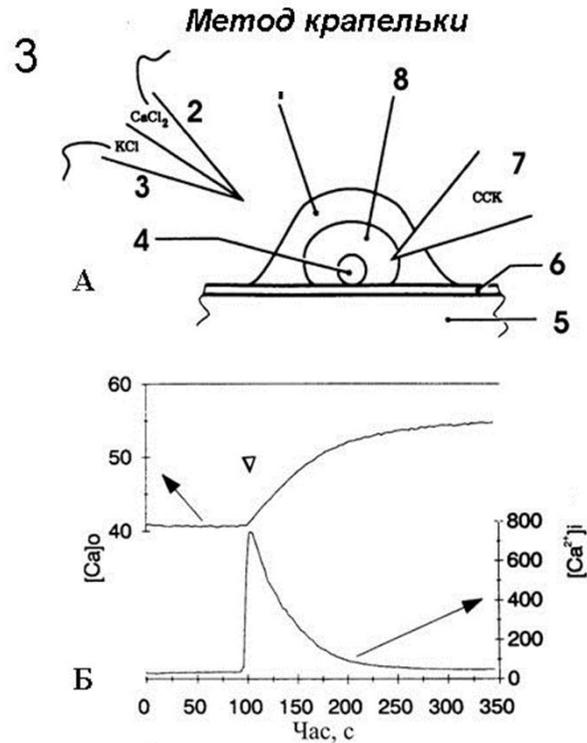
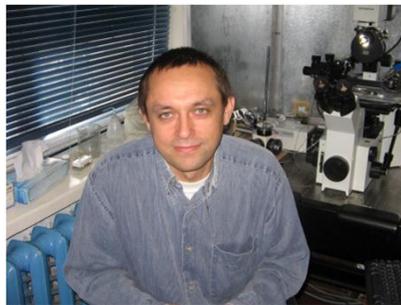


# Экспериментальная установка для визуализации кальция с помощью красителя indo-1





# Метод капельки



**А.** Схематичний рисунок, пояснючий 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 ацинарних 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 ( $[Ca]_o$ ) (верхня крива, ліва вісь, мМ) як результат стимуляції високою дозою ССК.

# Ratiometric vs. NonRatiometric

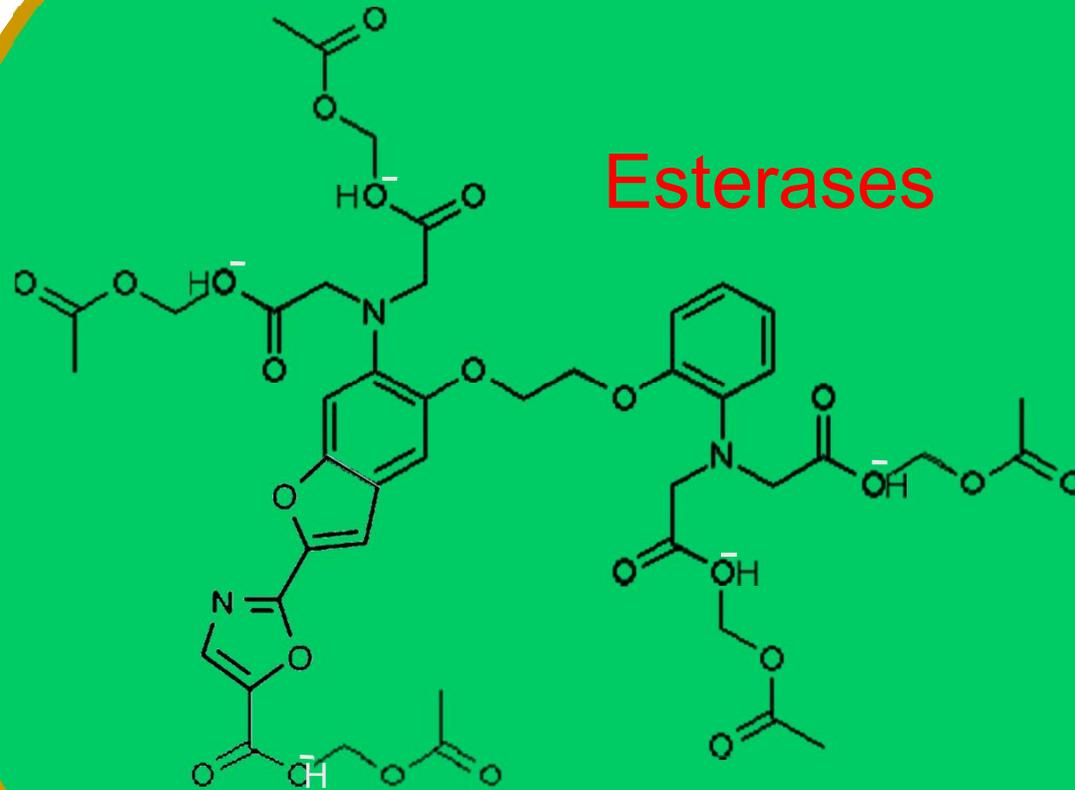
- **Ratiometric**
  - Красители indo-1 and fura-2
  - Позволяют производить коррекцию, связанную с изменением объема и концентрации красителя
  - Позволяют определять абсолютную концентрацию ионов кальция
  - Требуют более сложного оборудования и калибровки
- **Nonratiometric**
  - Красители fluo-3, rhod-2 и семейство Calcium Green
  - Позволяют определять относительные изменения концентрации ионов кальция
  - Простота использования

# Процедура загрузки зонда

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

# Fura2 AM

Esterases





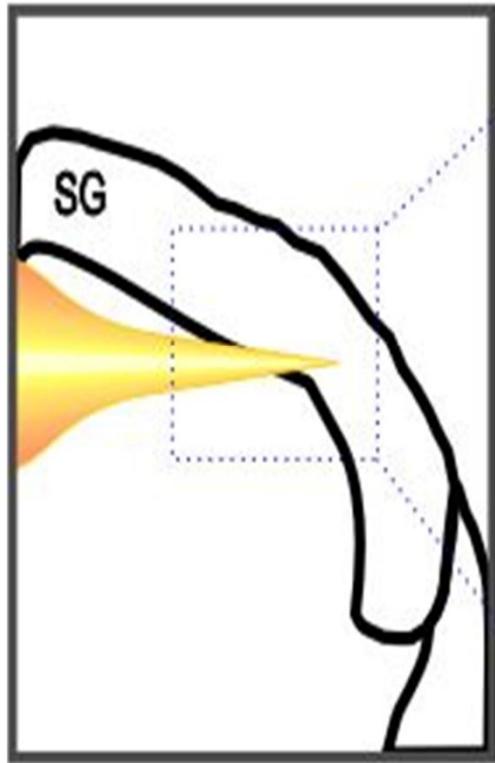
- **Микроинъекция**

- Инъекция индикатора, растворенного во внутриклеточном растворе через стеклянный микроэлектрод под давлением или с помощью электрофореза

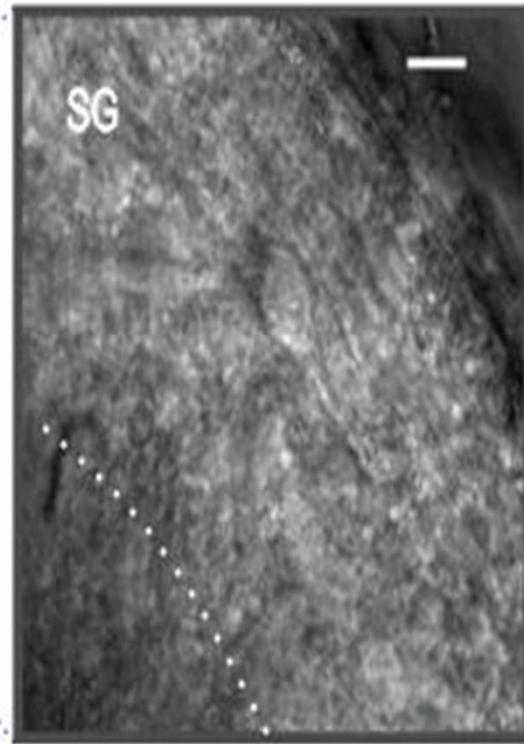
- **Загрузка через Patch-Clamp пипетку**

- Пассивная диффузия и диализ внутриклеточного содержимого

A



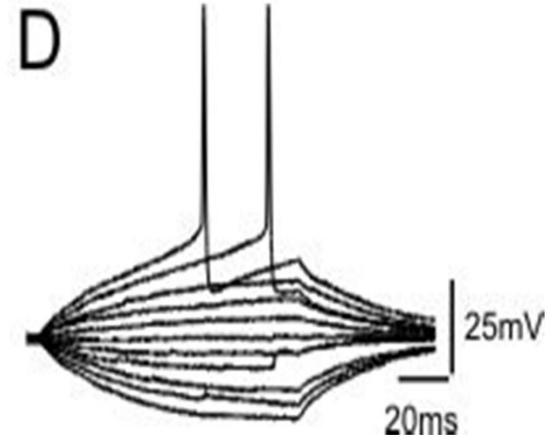
B

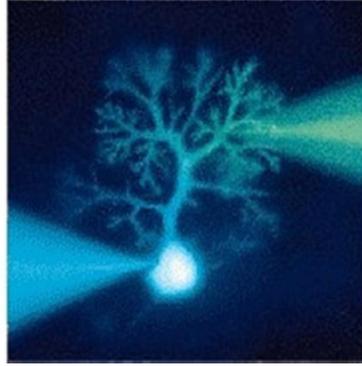


C

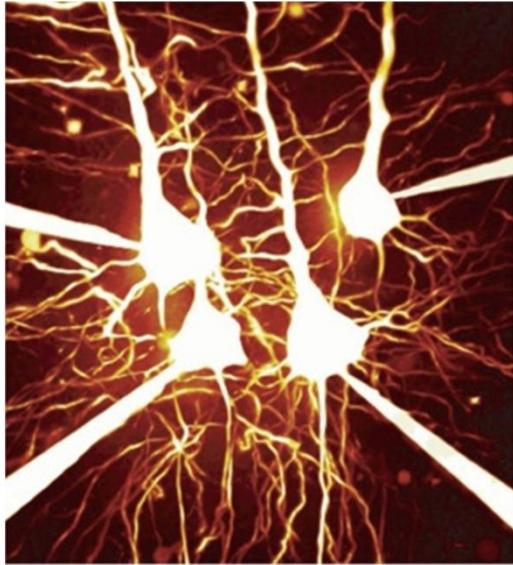


D

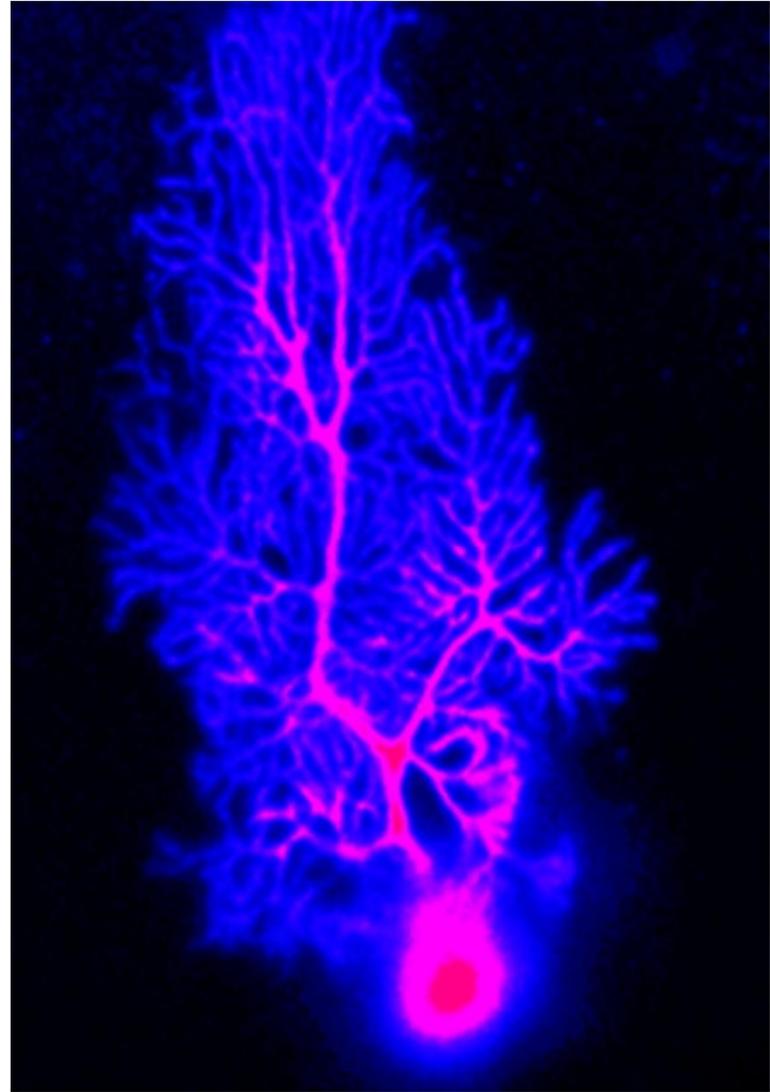


**A****B**

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.



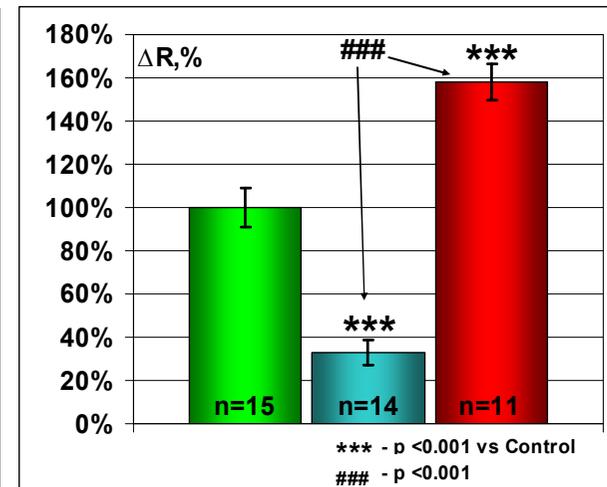
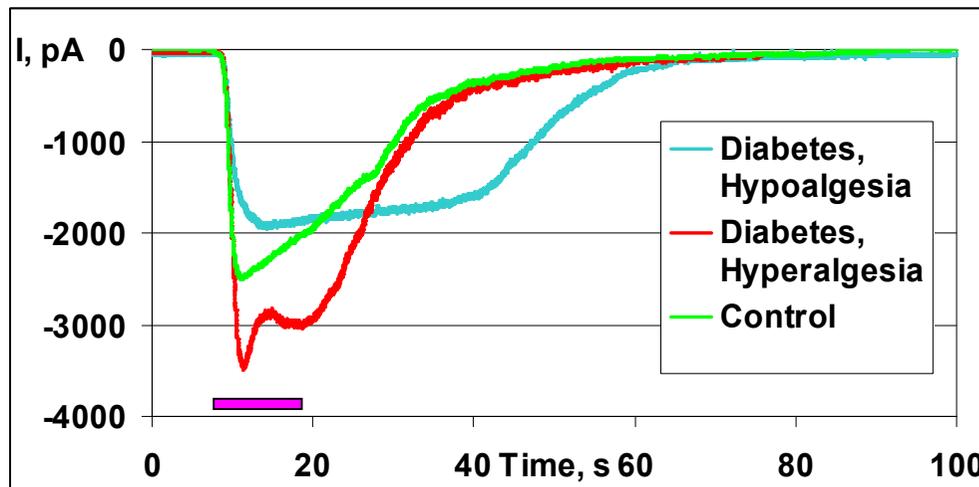
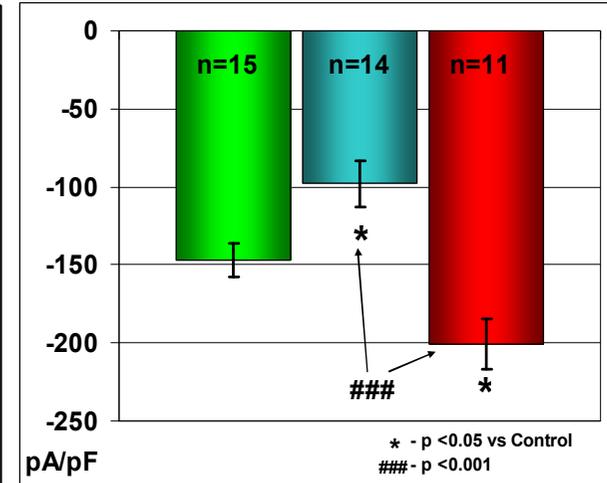
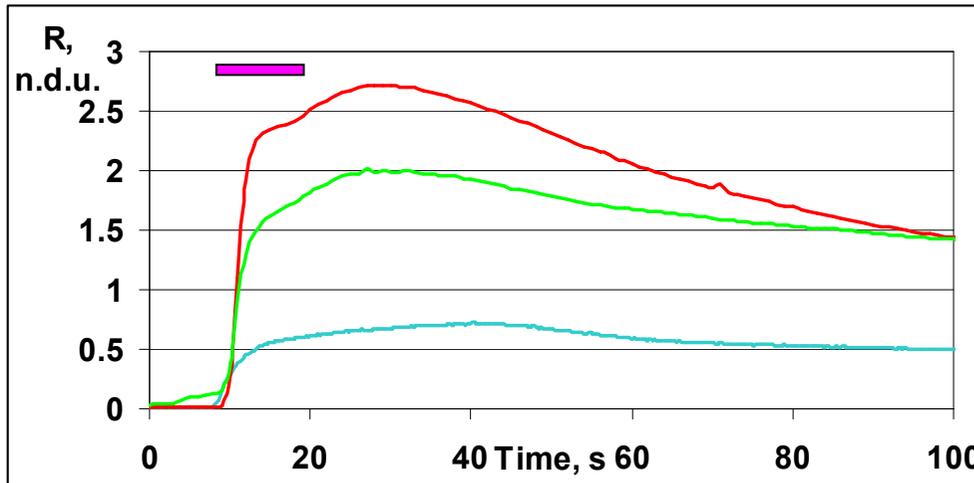
Hot calcium in a Purkinje neuron.

# Потенциальные проблемы и методы их разрешения

- Внутриклеточная буферизация
  - Индикатор может изменять  $[Ca^{2+}]_i$  при загрузке в высоких концентрациях
- Цитотоксичность
  - Могут повреждать некоторые типы клеток
  - Могут влиять на редокс-метаболизм или пролиферацию клеток
- Автофлуоресценция
  - Коллагеновые волокна и кальцификаты могут давать автофлуоресценцию
  - Пиридиновые нуклеотиды также могут автофлуоресцировать. ( NADH, NADP, FAD, и FMN)
- Выгорание
  - Слишком сильное освещение
  - Может быть уменьшено оксигенированием или добавлением антиоксидантов
- Компарментализация
  - Индикаторы захватываются внутриклеточными органеллами; распределение индикаторов по клетке теряет гомогенность
- Связывание с другими ионами и протеинами
  - Индикаторы могут связываться с внутриклеточными белками или ионами и менять свои спектральные и кинетические свойства, а также константу диссоциации
- Вытекание красителя
  - Индикаторы могут вытекать из клетки во внеклеточную среду
  - Вытекание регулируется системой транспорта анионов
  - Оно может быть уменьшено понижением температуры



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



# 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!**

