

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73
С56

Авторы: Е.В. Барковский, С.Б. Бокуть, А.Н. Бородинский, В.У. Буко, О.И. Валентюкевич, А.И. Грицук, Е.О. Данченко, Е.М. Дорошенко, И.К. Дремза, А.С. Дроздов, И.Б. Заводник, Л.Б. Заводник, Д.Я. Задорожный, Л.М. Караедова, В.Н. Кипень, Е.И. Коваленко, Е.А. Лапшина, Т.Л. Лебедь, О.Я. Лукивская, Г.В. Ляхнович, А.Ф. Макарчиков, С.Б. Мельнов, Е.В. Морозова, И.М. Морозова, Л.И. Надольник, Е.Е. Нарута, В.Н. Никандров, Л.Н. Николаевич, Н.В. Пивень, Н.С. Пыжова, В.Ю. Смирнов, Э.П. Титовец, Т.А. Толкачева, В.В. Хрусталеv, В.Т. Чещевик, А.А. Чиркин

Рецензенты: кафедра биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета (заведующий кафедрой доцент *И.В. Семак*); заведующий отделом биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» доктор биологических наук *В.Н. Решетников*

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или любой ее части не может быть осуществлено без разрешения издательства

Современные проблемы биохимии. Методы исследований : учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.] ; под ред. проф. А. А. Чиркина. – Минск : Выш. шк., 2013. – 491 с. : ил.

ISBN 978-985-06-2192-4.

Учебное пособие составлено из трудов специалистов-биохимиков Республики Беларусь.

Изложено 190 методик биохимического исследования различных биологических объектов на различных уровнях их организации.

Для магистрантов учреждений высшего образования по биологическим и медицинским специальностям.

Может быть полезно студентам биологических, медицинских, ветеринарных и фармацевтических специальностей, а также исследователям-биохимикам.

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-06-2192-4

© Оформление. УП «Издательство
«Вышэйшая школа»», 2013

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИИ ФАГОЦИТОЗА

Е.И. Коваленко, А.А. Чиркин

Белорусский государственный университет, Витебский государственный университет им. Машерова

Воспаление представляет собой патофизиологический процесс, развивающийся в васкуляризированных тканях и органах в ответ на любое местное повреждение и проявляющийся в виде ряда поэтапных изменений, направленных на локализацию, разведение, изоляцию и устранение агента, вызвавшего повреждение, а также на восстановление поврежденной ткани [1]. Воспаление играет, в первую очередь, защитную роль, однако механизмы воспаления приводят к вторичному тканевому самоповреждению, в связи с чем возникает необходимость применения противовоспалительных средств.

Важным этапом воспаления является хемотаксис (направленная миграция) лейкоцитов и осуществляемый ими фагоцитоз. Фагоциты (нейтрофилы, моноциты), участвуя в воспалении, генерируют эндогенные окислители (активные формы кислорода и галогенов, АФК), оксид азота и высвобождают во внеклеточную среду гидролазы, пероксидазы, оказывающие сильное цитотоксическое действие на клетки паразитов и бактерий и на ткани организма хозяина (рисунок 1). Именно с фагоцитами связывают вторичное самоповреждение тканей, поэтому проводятся исследования биохимических и биофизических механизмов активации этих клеток и разрабатываются способы противовоспалительной терапии, включающие регуляцию активности фагоцитов.

Нейтрофилы и моноциты активируются при действии медиаторов воспаления (цитокинов, хемоаттрактантов) и генерируют окислители с участием ферментов НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО). Сегментоядерные нейтрофилы являются наиболее многочисленными лейкоцитами крови и характеризуются высоким содержанием редокс-ферментов. НАДФН-оксидаза представляет собой мембрано-ассоциированный белковый комплекс, разобщенный в неактивированных клетках и собираемый при их активации [2]. НАДФН-оксидаза катализирует образование супероксидных анион-радикалов $\cdot\text{O}_2^-$ внутри фагосом или у наружной поверхности клеток. Из $\cdot\text{O}_2^-$ спонтанно или с участием фермента супероксиддисмутаза образуется H_2O_2 . МПО относится к водорастворимым ферментам класса пероксидаз, катализирующим окисление различных субстратов в присутствии H_2O_2 . При функционировании МПО также генерируется гипохлорит OCl^- . Компоненты НАДФН-оксидазы и МПО в неактивированных нейтрофилах депонированы в лизосомальных гранулах, поэтому процессу генерации АФК предшествуют процессы дегрануляции. Механизмы активации

нейтрофилов и сборки систем генерации АФК могут включать активацию путей внутриклеточной передачи сигналов, зависящих от уровня свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле, активации фосфолипаз С, D, A_2 , серин/треониновых и тирозиновых протеинкиназ, липокси- и циклооксигеназ, гуанилат- и аденилат-циклаз, образования инозитол-3-фосфата, диацилглицерола, фосфатидной кислоты, арахидоновой кислоты и др. [3]. Таким образом, для понимания причин патологических изменений и определения подходов к регуляции активности нейтрофилов и их участия в воспалении необходимо исследование механизмов внутриклеточной передачи сигналов в этих клетках в норме и при заболеваниях.

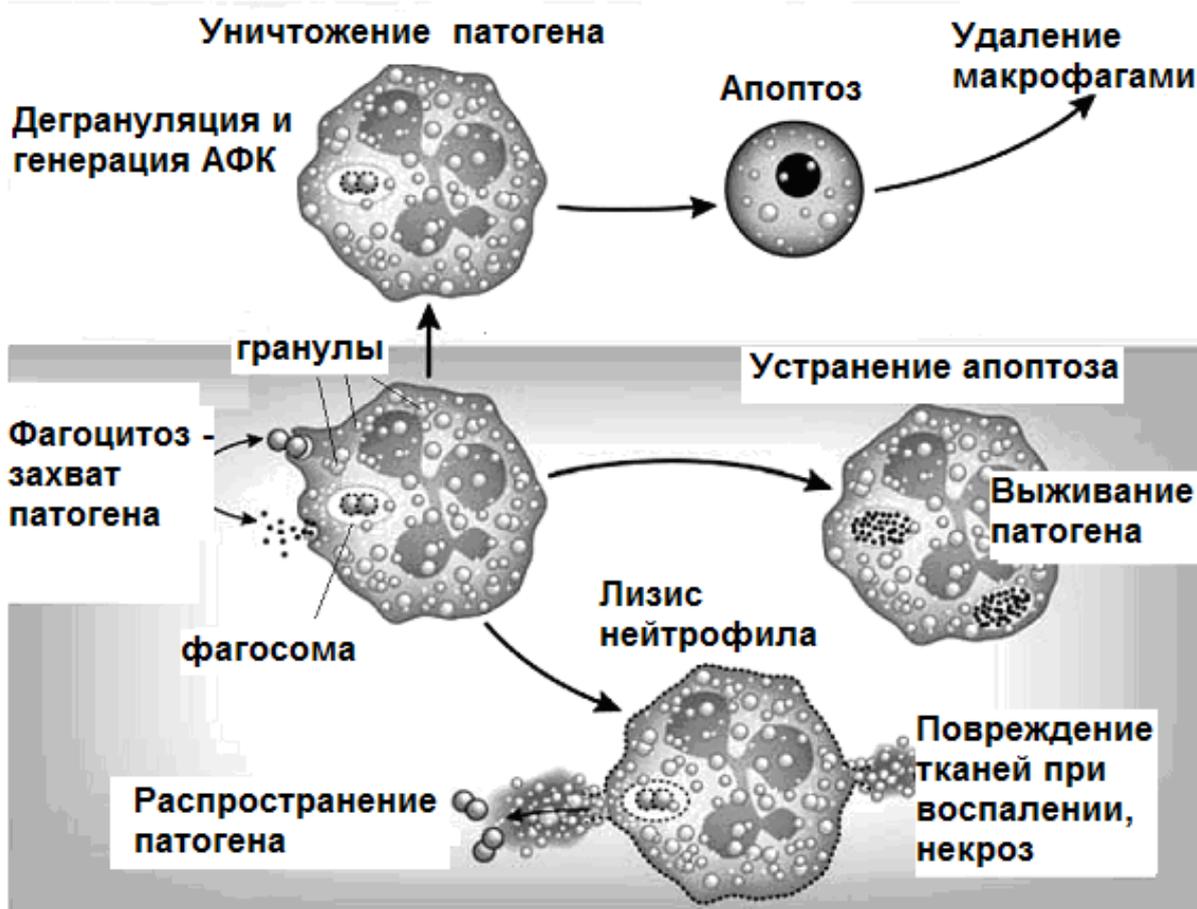


Рисунок 1. Фагоцит захватывает патоген внутрь фагосомы; при «благоприятном развитии событий» в фагосому из гранул клеток попадают гидролитические и кислородоактивирующие ферменты, разрушающие микроорганизм, сам нейтрофил подвергается апоптозу и удаляется макрофагами. Однако, в некоторых случаях нейтрофилы не способны разрушить инфекционные агенты, АФК генерируются у наружной поверхности клеток, сами нейтрофилы лизируются и индуцируют повреждение окружающих тканей

Ниже рассмотрены методы изолирования нейтрофилов из крови человека, определения их жизнеспособности, изучения процессов генерации клетками АФК, выявления активации путей внутриклеточной передачи сигналов при воздействии различных факторов на нейтрофилы.

1. Выделение нейтрофилов крови человека

Реагенты и оборудование

1. Водные растворы NaCl (0,15 М и 0,3 М)
2. Раствор высокомолекулярного декстрана (100.000–500.000) в 0,15 М NaCl, концентрация 6–7 %
3. Раствор фиколл-урографина (или гистопак, лимфопреп) с плотностью 1,077 г/см³
4. Венозная кровь, стабилизированная гепарином или 3,8 % раствором цитрата натрия
5. Сбалансированный солевой буферный раствор с рН 7,2–7,4 (например, среда Эрла, среда Хенкса, фосфатный солевой буфер)
6. Дозаторы, пробирки центрифужные
7. Центрифуга (1500–2000 оборотов/мин)
8. Камера Горяева, световой микроскоп

Процедура (основана на методе Бейума)

1. *Седиментация эритроцитов в присутствии декстрана.* Во флакон (пробирку, пластиковый шприц) с венозной стабилизированной кровью добавить раствор декстрана из расчета 5:1, перемешать, перевернув 4 раза, затем в течение 40–60 мин проинкубировать при комнатной температуре. В результате эритроциты оседают в нижний темный слой, а лейкоциты остаются в верхнем желтом слое. (Можно использовать 6 % раствор декстрана-70, добавляя его к крови в соотношении 2:1)

2. *Разделение лейкоцитов в градиенте плотности.* В центрифужные пробирки налить по 3–4 мл фиколл-урографина (1,077 г/см³), не касаясь стенок пробирок. Из флакона осторожно собрать желтый слой плазмы с лейкоцитами, не допуская перемешивания слоев, и медленно, упираясь наконечником дозатора в стенку пробирки, наложить ее на слой фиколл-урографина (также не допуская перемешивания). Полученные образцы центрифугировать при 1500–2000 оборотов/мин в течение 30–35 мин. В результате мононуклеарные лейкоциты (лимфоциты, моноциты, бластные, незрелые клетки) и тромбоциты, имеющие меньшую плотность, оказываются в межфазном белом слое, а гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и остаток эритроцитов, имеющие плотности более 1,077 г/см³, оказываются в осадке. Для получения нейтрофилов необходимо из пробирок удалить всю надосадочную жидкость, оставив только осадок с гранулоцитами.

3. *Удаление примеси эритроцитов и отмывка.* Для избавления от примеси эритроцитов к осадку с гранулоцитами добавить 1 мл

дистиллированной ледяной воды и интенсивно перемешать в течение 20 секунд. В результате эритроциты, более подверженные лизису при гипотонических условиях, чем лейкоциты, разрушатся. Изотоничность восстановить внесением 1 мл 0,3 М NaCl. Затем для получения чистой фракции гранулоцитов необходимо «отмыть» клетки путем центрифугирования в 0,15 М NaCl или буферном растворе в течение 8–10 мин. При этом внеклеточные белки (в том числе, гемоглобин), другие полимеры и малые молекулы останутся в надосадочной жидкости, а клетки осядут на дно. Отмытый осадок гранулоцитов ресуспензировать в буферном растворе.

4. *Жизнеспособность клеток и состав фракции гранулоцитов.* При использовании крови здоровых людей фракция гранулоцитов преимущественно состоит из нейтрофилов (чистота составляет не менее 96 %). Однако, следует учитывать, что у больных людей при некоторых патологиях (например, онкогематологических или острых аллергических заболеваниях, гельминтозах) во фракции гранулоцитов может значительно увеличиться доля эозинофилов, что следует контролировать с помощью морфологических исследований. Для определения количества клеток в суспензии используется камера Горяева (или гемоцитометр) и световой микроскоп. У здоровых людей в ходе описанной процедуры выделения клеток, как правило, удается получить 10–20 млн. нейтрофилов из 10 мл крови, с чистотой и жизнеспособностью более 95 %.

Неактивированные нейтрофилы представляют собой округлые клетки с сегментированным ядром (n – сегменты ядра) и множеством гранул различной величины (см. рисунок 2, [4, 5]).

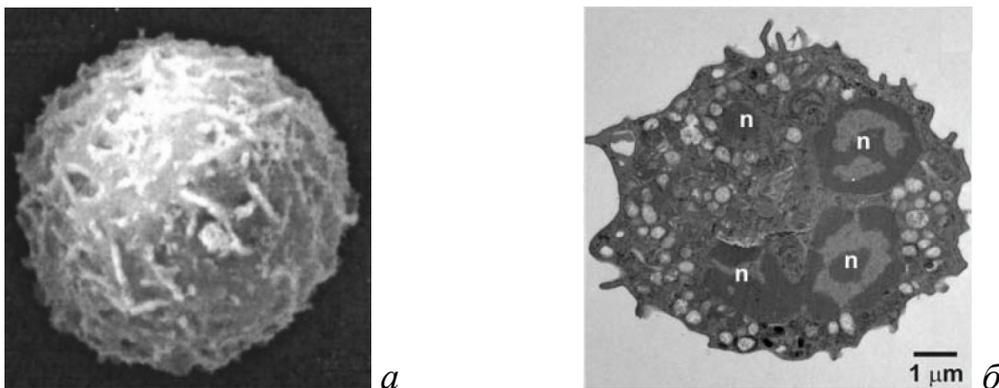


Рисунок 2. Микрофотографии нейтрофила, полученные сканирующей (а) и трансмиссионной (б, n – сегменты ядра) электронной микроскопией

2. Определение жизнеспособности клеток

При изолировании нейтрофилов из крови, клетки могут разрушаться, утрачивать способность к функционированию. Снижение жизнеспособности клеток *in vivo* наблюдается при развитии некоторых патологий, например, аутоиммунных. К гибели клеток *in vivo* и *in vitro*

могут приводить различные физико-химико-биологические воздействия такие как ионизирующие излучения и жесткий УФ в высоких дозах, кислоты, щелочи, активные формы кислорода и другие химически-активные соединения, вирусы, бактерии, различные лекарственные вещества и прочее. В связи с этим, оценку жизнеспособности клеток следует проводить при выполнении любых исследований на клетках. Существует ряд различных способов определения гибели клеток, для нейтрофилов наиболее подходящими и доступными являются следующие.

2.1. С использованием витальных красителей (трипанового синего, метиленового синего, эритрозина В, нигрозина) и световой микроскопии

Данный тест позволяет быстро и просто оценить жизнеспособность клеток по состоянию их плазматических мембран. Если мембрана интактна, то такие красители как трипановый синий, метиленовый синий, эритрозин В, нигрозин не проникают внутрь клетки и не окрашивают ее, если же барьерная функция мембраны нарушена и клетка нежизнеспособна, она окрашивается красителем.

Реагенты и оборудование

1. Сбалансированный солевой буферный раствор с рН 7,2–7,4 (например, Среда Эрла, Среда Хенкса, фосфатный солевой буфер (ФСБ))
2. Краситель (трипановый синий, метиленовый синий, эритрозин В, нигрозин)
3. Суспензия клеток
4. Дозаторы, пробирки
5. Центрифуга (1000–1500 оборотов/мин)
6. Камера Горяева, световой микроскоп

Процедура

1. Приготовить 1 % раствор красителя в буферном растворе при продолжительном перемешивании. Для удаления нерастворенных агломератов красителя раствор центрифугировать 5 мин и собрать супернатант.

2. Смешать 100 мкл клеточной суспензии и 50–100 мкл раствора красителя.

3. С помощью светового микроскопа и камеры Горяева подсчитать процент окрашенных клеток. Предпочтительно подсчитывать не менее 100 клеток. Относительная погрешность метода составляет около 10 %. Подсчет необходимо проводить сразу после того, как клетки осядут на дно камеры Горяева, поскольку через 5 мин все клетки начинают активно поглощать краситель путем пиноцитоза.

2.2. С использованием флуоресцентных зондов, взаимодействующих с ДНК (иодида пропидиума, акридинового

оранжевого, бромида этидиума), и люминесцентной микроскопии или флуориметрии

Процедура 1 (люминесцентная микроскопия)

1. К клеточной суспензии добавляют смесь растворов акридинового оранжевого (100 мкг/мл в ФСБ) и бромида этидиума (100 мкг/мл в ФСБ) из расчета 1:1 и инкубируют в течение 10 мин. Затем клетки осаждают центрифугированием и переводят в свежий буферный раствор, наносят на стекло.

2. С использованием люминесцентного микроскопа подсчитывают доли живых (флуоресцирующих зеленым) и нежизнеспособных (флуоресцирующих оранжево-красным цветом) клеток при длине волны возбуждения 495 нм, испускания – 515 нм.

Процедура 2 (флуориметрия)

1. К клеточной суспензии добавляют 4 мкМ иодид пропидиума, инкубируют в течение 5 мин. Затем измеряют флуоресценцию ($F_{\text{п}}$) на длине волны 645 нм, (длина волны возбуждения – 530 нм). Иодид пропидиума проникает через мембраны поврежденных клеток и встраивается путем интеркаляции в ДНК и РНК (также может связывается с нуклеиновыми кислотами, высвобождающимися из разрушающихся клеток во внеклеточную среду), при этом интенсивность флуоресценции зонда значительно возрастает. Также измеряют интенсивность флуоресценции иодида пропидиума $F_{\text{к1}}$ в контрольных образцах – буферной среде, не содержащей клеток.

2. Клетки разрушают с использованием 0,1 % Triton X-100 и регистрируют интенсивность флуоресценции ($F_{\text{о}}$), отражающую полное содержание нуклеиновых кислот в клетках. Измеряют интенсивность флуоресценции зонда $F_{\text{к2}}$ в контроле (буферная среда) в присутствии 0,1 % Triton X-100.

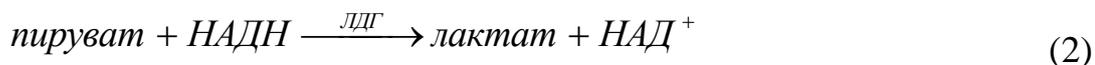
3. Долю поврежденных клеток X рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(F_{\text{о}} - F_{\text{к2}}) - (F_{\text{п}} - F_{\text{к1}})}{F_{\text{о}}} \quad (1)$$

2.3. На основе анализа “утечки” цитозольных белков во внеклеточную среду

Цитозольные белки, обеспечивающие внутриклеточные метаболические процессы и не подвергаемые секреции, могут высвободиться из клеток только при повреждении плазматической мембраны, что позволяет оценивать гибель клеток на основе анализа содержания этих белков во внеклеточной среде. Можно проводить определение лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкоксидазы. Содержание ЛДГ выявляют, определяя активность фермента по скорости реакции

взаимодействия пирувата и НАДН с образованием лактата и НАД⁺, катализируемой ЛДГ:



Уменьшение концентрации НАДН в образцах за 1 мин, детектируемое по изменению оптической плотности образцов на длине волны 340 нм (ΔD), пропорционально активности ЛДГ (A): $A \sim \Delta D$. Восстановленная форма НАДН имеет выраженный максимум поглощения в ультрафиолетовой области на 340 нм, тогда у окисленной формы НАД⁺ этот максимум отсутствует. Различия в поглощении НАД⁺ и НАДН между 300 и 400 нм обусловлены изменениями никотинамидного кольца при окислении или восстановлении.

Реагенты и оборудование

1. Суспензия клеток
2. Изучаемый действующий фактор, например, лекарственные соединения, ингибиторы, факторы роста, цитокины, источники АФК
3. Набор для определения активности ЛДГ кинетическим методом («Анализ-Х», Беларусь)
4. Дозаторы, пробирки
5. Центрифуга (1000–1500 оборотов/мин)
6. Спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность на длине волны 340 нм, например, РV 1251С («Солар», Беларусь) и кювета

Процедура

1. Приготовить растворы: трис-буфер, раствор пирувата, раствор НАДН содержащие субстраты ЛДГ (пируват, НАДН) согласно прописям, прилагаемым к набору для определения ЛДГ

2. Нейтрофилы ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл), суспензированные в буферном растворе, распределить по контрольным и опытным пробиркам и проинкубировать в течение выбранного времени (от 15 мин до нескольких часов) под влиянием изучаемых воздействий (опытные образцы) или в отсутствие воздействий (контрольные образцы).

3. Клетки осадить центрифугированием в течение 5–7 мин при 1500 оборотов/мин. Надосадочную жидкость, содержащую высвобожденные из клеток белки, собрать в отдельные пробирки. В этих образцах далее будет проводиться определение активности ЛДГ, вышедшей из клеток (A_n).

4. Клетки, содержащиеся в осадке, ресуспензировать в буферном растворе, восстановив исходный объем. Полностью разрушить клетки, добавив Triton X-100 в концентрации 0,1 % и проинкубировать в течение 30

мин. Данные образцы необходимы для оценки общего содержания ЛДГ в клетках (A_0).

5. В среду, содержащую 80 мМ трис-НСl рН=7,5, 200 мМ NaCl, 1,6 мМ пируват, 0,2 мМ НАДН добавить 40 мкл исследуемой жидкости и затем определить скорость реакции, регистрируя оптическую плотность на длине волны 340 нм с интервалом 1 мин и рассчитывая среднее значение ΔD за 1 мин. В результате получим средние значения ΔD_{Π} и ΔD_0 , соответствующие A_{Π} и A_0 .

6. Долю поврежденных клеток X рассчитать по формуле:

$$X = \frac{A_{\Pi}}{A_0} = \frac{\langle \Delta D_{\Pi} \rangle}{\langle \Delta D_0 \rangle} \quad (3)$$

На рисунке 3 приведен пример исследования повреждающего действия пероксида водорода на нейтрофилы по высвобождению ЛДГ во внеклеточную среду. Как следует из рисунка, результирующий эффект зависит от времени действия повреждающего фактора.

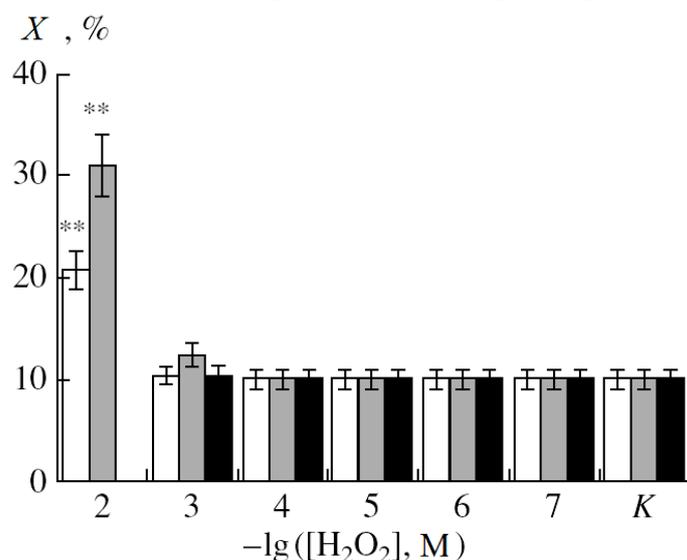


Рисунок 3. Высвобождение ЛДГ из нейтрофилов, индуцированное добавлением H_2O_2 в концентрациях $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Белые столбы – однократное внесение H_2O_2 и инкубирование клеток в течение 30 мин; серые – однократное внесение H_2O_2 и инкубирование в течение 60 мин; черные – десятикратное внесение H_2O_2 с интервалами 1 мин, и последующее инкубирование в течение 30 мин; K – контроль, без добавления H_2O_2 . ** — уровень значимости различий $p < 0,01$.

3. Исследование генерации АФК

К методам регистрации АФК ($\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $HO\cdot$, $HOCl$, 1O_2 , NO , $ONOO^-$) относятся: метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР),

позволяющий выявлять молекулы, атомы, ионы с неспаренными электронами, метод люминесцентных зондов с использованием индикаторных соединений, у которых изменяются параметры люминесценции при взаимодействии с АФК, спектрофотометрический анализ продуктов, возникающих в результате действия АФК. В качестве индикаторов формирования АФК используются мембранопроникающие и мембранонепроникающие вещества. Нитросиний тетразолий (НВТ) взаимодействует с $\cdot\text{O}_2^-$ и позволяет визуализировать активацию НАДФН-оксидазы внутри фаголизосом с использованием метода световой микроскопии. Дихлордигидрофлуоресцеин окисляется при взаимодействии с H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$, HOCl , ONOO^- с образованием продукта, имеющего высокий квантовый выход флуоресценции, что позволяет использовать его в качестве флуоресцентного зонда на АФК. Мембранопроникающими формами дихлордигидрофлуоресцеина являются его эстеры, которые внутри клеток подвергаются действию эстераз, после чего уже не могут покинуть клетку и характеризуют процессы именно внутриклеточной генерации АФК. Дигидрорадамин часто применяют в качестве мембранопроникающего флуоресцентного зонда на H_2O_2 в проточной цитометрии [6].

Люминол и люцигенин вступают в химическое взаимодействие с АФК, в результате чего образуются продукты в возбужденном энергетическом состоянии, растрачивающие избыток энергии путем излучения квантов света (сине-фиолетовая область спектра). Такое явление называется хемилюминесценцией, причем люцигенин является зондом на $\cdot\text{O}_2^-$, а люминол – на $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$, HOCl , $^1\text{O}_2$. Люминол легко проникает через мембраны и отражает процессы генерации АФК и снаружи, и внутри клеток; для регистрации внеклеточной продукции АФК используют непроникающий через мембраны изолюминол. С применением специфических ингибиторов путей внутриклеточной трансдукции сигналов можно проводить исследования участия различных ферментов и вторичных мессенджеров в процессах, приводящих к генерации фагоцитами АФК.

Реагенты и оборудование

1. Суспензия фагоцитов (нейтрофилов) в сбалансированном солевом буферном растворе с рН 7,2–7,4
2. Активаторы клеток (например, хемотаксический пептид fMLP, зимозан, частицы латекса, форболовый эфир РМА, Ca^{2+} -ионофоры)
3. Ингибиторы (например, Ca^{2+} -блокаторы верапамил, нифедипин, ингибитор фосфолипазы A_2 и циклооксигеназ индометацин, ингибитор МПО салицилгидроксамиковая кислота, ингибитор продукции простагландинов аспирин, ингибитор НАДФН-оксидазы)

4. Праймирующие агенты (например, интерферон, интерлейкин 1 β , интерлейкин 6, гранулоцит-колониестимулирующий фактор G-CSF)
5. Люминол, люцигенин (в концентрации 50 мкМ)
6. Дозаторы, кварцевая кювета
7. Хемилюминометр

Процедура

1. Изолированные фагоциты, суспензированные в буферном солевом растворе, проинкубировать в присутствии праймирующего фактора или ингибитора при температуре 37 °С.

2. Суспензию клеток (1–2 млн. клеток), поместить в кювету, добавить люминол (или люцигенин) и с помощью хемилюминометра зарегистрировать кинетические зависимости интенсивности генерации АФК клетками при их активации в ходе адгезии на дно кюветы (без перемешивания!).

3. Затем добавить стимуляторы активности нейтрофилов – хемоаттрактанты, индукторы фагоцитоза, Ca²⁺-ионофоры, РМА и зарегистрировать соответствующие кинетические зависимости интенсивности генерации АФК.

4. Сравнивая зависимости, полученные в отсутствие или при действии исследуемого воздействия, рассчитать величину ингибирующего или стимулирующего эффекта. В качестве физических величин для расчетов можно использовать значение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) спустя определенное время после начала действия фактора или площадь под кривой за выбранное время.

На рисунках 4–7 показаны примеры исследования процессов генерации нейтрофилами АФК методом люминол-опосредованной ХЛ при активации клеток в ходе адгезии, при действии фактора роста гранулоцитов и интерлейкина 1 β , а также некоторых ингибиторов и веществ, используемых в качестве лекарственных средств.

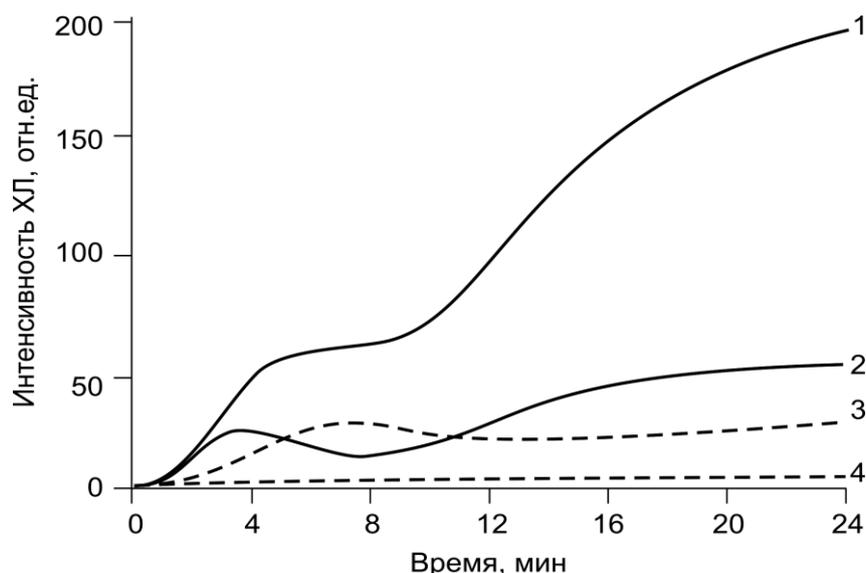


Рисунок 4. Кинетические зависимости интенсивности ХЛ нейтрофилов в присутствии люминола (1, 2) и люцигенина (3, 4) в ходе адгезии клеток на поверхность стекла в отсутствие (1, 3) и при действии ингибитора НАДФН-оксидазы дифенилиодида (2, 4)

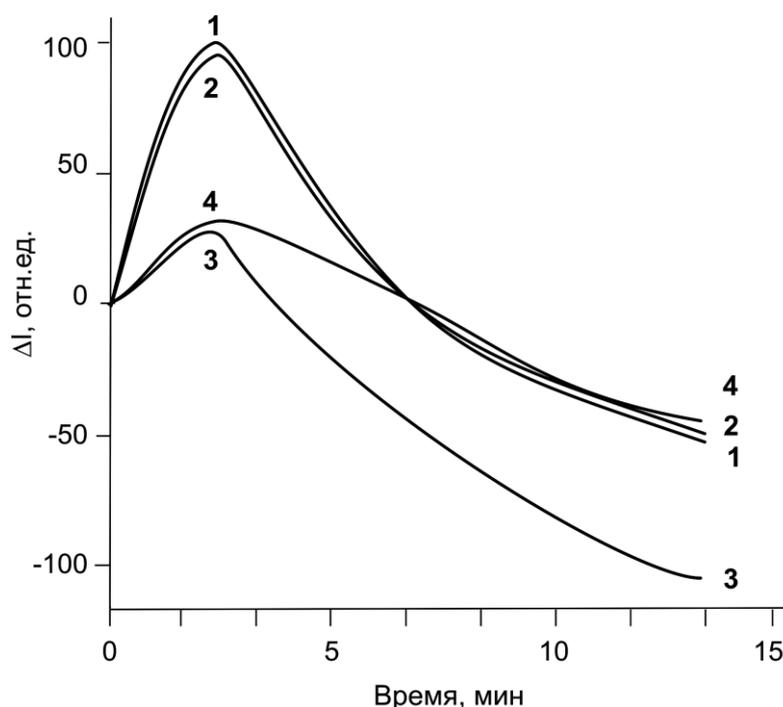


Рисунок 5. Кинетические зависимости генерации нейтрофилами АФК, обусловленной действием G-CSF, в отсутствие (1) и присутствии ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты (2 – ингибирование циклооксигеназы, 3 – ингибирование фосфолипазы A_2 , 4 – ингибирование 5-липоксигеназы). ΔI – разность интенсивностей люминол-опосредованной ХЛ клеток при их адгезии в присутствии и отсутствие G-CSF в среде

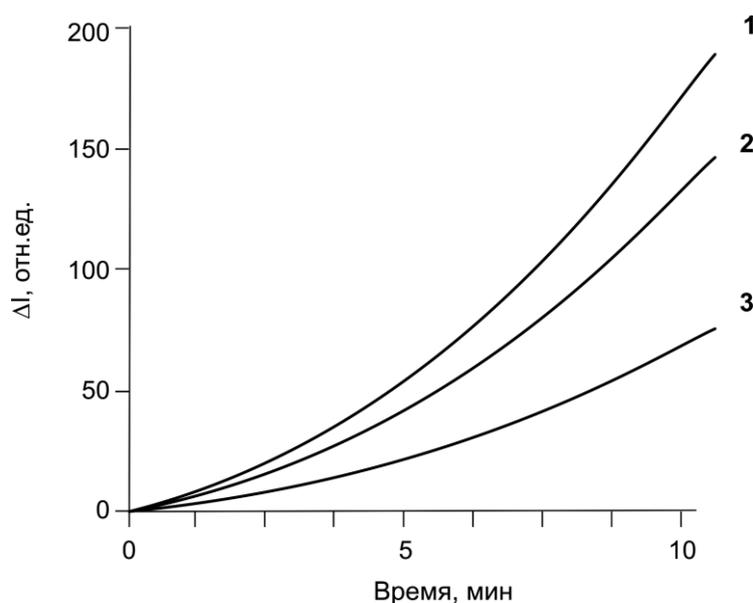


Рисунок 6. Кинетические зависимости генерации нейтрофилами АФК, обусловленной действием интерлейкина 1β , в отсутствие (1) и присутствии $0,5 \text{ мкМ}$ индометацина (2), $0,5 \text{ мМ}$ аспирина (3). ΔI – разность интенсивностей люминол-опосредованной ХЛ клеток при их адгезии в присутствии и отсутствие интерлейкина 1β в среде

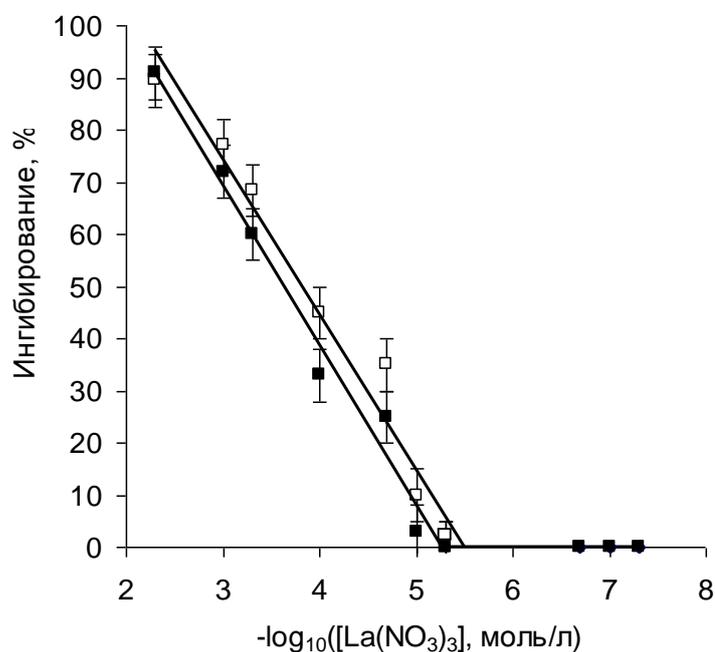


Рисунок 7. Ингибирующее действие $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ на генерацию АФК нейтрофилами, активированными в ходе адгезии на стекло (□) и при фагоцитозе клетками латекса (■). Ингибирование рассчитывали по формуле $\frac{(I_0 - I)}{I_0} \cdot 100\%$, где I_0 – интегральная интенсивность ХЛ в отсутствие $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, а I – в присутствии $\text{La}(\text{NO}_3)_3$.

4. Изучение процессов активации клеток, связанных с изменением концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле

Ионы Ca^{2+} относятся к универсальным внутриклеточным мессенджерам, обеспечивающим передачу регуляторных сигналов внутри различных типов клеток. Общее содержание ионов кальция в плазме крови составляет $\sim 2,5$ мМ, из них около половины связано с органическими фосфатами и белками, и свободных ионов Ca^{2+} оказывается около 1,2 мМ. Внутри клетки концентрация Ca^{2+} в цитозоле на 3–4 порядка ниже и составляет десятые доли мкМ. Переход клеток, в частности, нейтрофилов из пассивного состояния в активное сопряжен с транзиторным повышением уровня Ca^{2+} в цитозоле на 1–2 порядка и обусловлен, в частности, активацией Ca^{2+} - и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых белков. Активация в нейтрофилах ферментов НАДФН-оксидазы, МПО, фосфолипазы A_2 , цикло- и липоксигеназ, функционирование (реорганизация) элементов цитоскелета являются Ca^{2+} -зависимыми [6, 7].

Продолжительное, в течение десятков минут перманентное повышение внутриклеточного уровня свободных ионов Ca^{2+} приводит, как правило, к гибели клеток. Установлено, что кратковременный, до десятков секунд скачок уровня Ca^{2+} в нейтрофилах может обеспечивать «прайминг» – подготовку клеток к последующей более длительной и интенсивной активации, способствовать экспрессии и активации антиоксидантных и других защитных ферментов в нейтрофилах, устранять апоптоз, обеспечивать более длительное существование клеток. При продолжительном поддержании концентрации Ca^{2+} в цитозоле нейтрофилов на повышенном уровне наблюдается длительная активация этих клеток, происходит накопление АФК и окислительных повреждений белков, ДНК, липидов в нейтрофилах, нарушаются функции и целостность мембран клеток, во внеклеточное пространство высвобождаются провоспалительные медиаторы, гидролитические ферменты, АФК, нейтрофилы погибают сами и повреждают окружающие клетки, ткани организма, промотируют развитие хронического воспаления и возникновение очагов некроза. В связи с этим для лечения воспалительных заболеваний представляют интерес вещества, способные предотвращать длительную перманентную активацию нейтрофилов и поддержание в них повышенного уровня Ca^{2+} , но не препятствующие транзиторному увеличению концентрации ионов кальция в цитозоле.

Системы транспорта Ca^{2+}

Ионы Ca^{2+} поступают внутрь клеток и депонируются во внутриклеточных ограниченных мембранами депо (митохондриях, лизосомах, ЭПР, комплексе Гольджи, ядре, других органеллах) с участием

специальных систем трансмембранного транспорта – различных типов Ca^{2+} -каналов, Ca^{2+} -АТФаз, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -переносчика, от активности которых и зависит результирующий уровень Ca^{2+} в цитозоле [3, 7]. Перенос Ca^{2+} через ионные каналы представляет собой перенос заряда и компенсируется противотоком других ионов. Противоток может обеспечиваться ионами K^+ : выявлено, что блокатор K^+ -каналов тетраэтиламмоний подавляет перенос Ca^{2+} через каналы.

При действии многих стимуляторов активности нейтрофилов, в том числе хемотактантов, IgG, индукторов фагоцитоза, опосредованно через активацию специфических рецепторов происходит активация фосфолипазы C (существуют различные типы), гидролизующей инозитол-фосфолипиды плазматической мембраны с высвобождением инозитол-3-фосфата (I_3P). На мембранах внутриклеточных депо (немитохондриальных) присутствуют чувствительные к I_3P рецепторы-каналы (I_3PR), которые при связывании с ним открываются, и происходит высвобождение Ca^{2+} в цитозоль. В мембранах депо присутствуют также I_3P -независимые каналы Ca^{2+} , чувствительные к рианодину и кофеину (RyR), физиологическим активатором которых является циклическая АДФ-рибоза (цАДФР). Синтез цАДФР осуществляется из НАД^+ АДФ-рибозилциклазами и стимулируется цГМФ. Оба типа рецепторов I_3PR и RyR имеют Ca^{2+} -связывающие сайты и активируются при низких концентрациях Ca^{2+} , ингибируются при высоких, причем связывание специфического активатора (I_3P или рианодин/цАДФР) увеличивает чувствительность к Ca^{2+} . Арахидоновая кислота и лейкотриены также способны влиять на активность этих каналов.

В плазматической мембране присутствуют депо-управляемые каналы (store-operated channels, SOC), открывающиеся при опустошении внутриклеточных депо, потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы (VGCC) L-типа и рецептор-управляемые каналы (receptor-operated channels, ROC), при открытии которых возникает поток Ca^{2+} из внеклеточной среды в клетку [3, 7]. Каналы L-типа (символ L обозначает long-lasting, долгоживущие, порог активации -10 мВ), будучи активированы, сохраняют это состояние довольно долго. Их повторяющиеся открывание обеспечивают длительный кальциевый ток через мембрану. VGCC L-типа блокируются некоторыми органическими азотосодержащими липофильными соединениями: производными 1,4-дигидропиридинов (нифедипином, нитрендипином), фенилалкиламинами (верапамилем, D-600), производными бензотиазепина (дилтиаземом), специфическим ингибитором каналов L-типа кальцисептином, лоперамидом, ω -агатоксином III, а также катионами металлов, которые имеют большее сродство связывания с каналом, чем Ca^{2+} (наиболее эффективны лантаноиды в микромолярных концентрациях). Участки связывания дигидропиридинов находятся с внешней стороны

мембраны, а участки связывания верапамила и дилтиазема на цитоплазматической стороне канала [3, 7].

Регуляция активности канала VGCC L-типа осуществляется фосфорилированием его белковой субъединицы α_1 цАМФ-зависимой, кальмодулин-зависимой, цГМФ-зависимой, С протеинкиназами. Причем, цАМФ-зависимая и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая протеинкиназы оказывают активирующее действие, а цГМФ-зависимая протеинкиназа и протеинкиназа С ингибируют проводимость этого канала вследствие различных сайтов фосфорилирования для этих протеинкиназ на α_1 субъединице канала. Жирорастворимые вторичные мессенджеры (эйкозапентаеновые кислоты, липоксигеназные метаболиты арахидоновой кислоты, фосфатидная кислота и др.) также оказывают регулирующее действие на активность канала.

Плазматическая мембрана и внутриклеточные Ca^{2+} -депо могут быстро доставлять Ca^{2+} в цитозоль через открытые ионные каналы, после чего медленно удаляют их путем активного транспорта с участием Ca^{2+} -АТФаз (PMCA плазматической мембраны и SERCA саркоплазматического/эндоплазматического ретикула Ca^{2+} -АТФазы) и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. Активность Ca^{2+} -АТФаз регулируется протеинкиназами А, С, кислыми фосфолипидами, полиненасыщенными жирными кислотами, ингибируется ванадатом, La^{3+} , тапсигаргином. Митохондрии, напротив, быстро удаляют Ca^{2+} из цитозоля с помощью Ca^{2+} -унипортера, который действует как канал во внутренней мембране митохондрий, и медленно высвобождают Ca^{2+} в цитозоль с участием $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. Захват Ca^{2+} митохондриями ограничивает подъем и определяет быстрый спад Ca^{2+} -сигналов, вызванных входом Ca^{2+} в клетку или мобилизацией Ca^{2+} из депо [3, 7]. Подавление дыхательной цепи митохондрий карбонил-цианид-м-хлорофенил-гидразоном эффективно блокирует аккумуляцию ими Ca^{2+} .

Методы регистрации внутриклеточной концентрации Ca^{2+}

Существуют оптические и неоптические (пэтч-кламп) методы измерения концентрации Ca^{2+} в клетках, среди них и новые развивающиеся высокоточные методы, позволяющие не только измерить концентрацию, но и провести визуализацию Ca^{2+} -зависимых процессов на субклеточном уровне с хорошим пространственным и временным разрешением – это методы цифровой видеомикроскопии, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, мультифотонной микроскопии [8]. Стандартными наиболее распространенными и более доступными методами являются методы люминесцентной спектроскопии и микроскопии. При этом используются специфичные индикаторы Ca^{2+} (зонды) небелковой и белковой природы, а также хелаторы Ca^{2+} , ингибиторы Ca^{2+} -каналов, Ca^{2+} -АТФаз, регуляторных ферментов.

В основе метода флуоресцентных зондов лежит значительное изменение спектральных свойств молекул зонда при его связывании с Ca^{2+} (изменение квантового выхода люминесценции, сдвиг спектра поглощения или испускания). Флуоресцентные индикаторы подразделяются на группы по ряду критериев и различаются по константам диссоциации (K_d), характеризующим аффинность связывания с Ca^{2+} , степени селективности к Ca^{2+} в сравнении с другими ионами, чувствительности к pH, способности накапливаться в различных клеточных компартментах и, конечно, по своим спектральным свойствам. Разработаны небелковые и белковые флуоресцентные и биолюминесцентные конструкции для определения Ca^{2+} (флуоресцентные белки “хамелеоны”, “камгару”, “перикамы” на основе мутантов GFP-подобных белков и кальмодулина, GFP-акворин Ca^{2+} -репортерные системы, тропонеоны на основе тропонина и мутантов GFP, биолюминесцентные сенсорные белки обелин, акварин/коэлентерозин) [8–10]. Ca^{2+} -сенсорные белки подробно рассмотрены в обзорах [8–10], они имеют большие перспективы применения при использовании методов генетической инженерии для направленного внедрения этих белков в субклеточные пространства. Остановимся на рассмотрении особенностей флуоресцентных зондов небелковой природы, более доступных для широкого применения.

Зонд подбирают для исследований концентраций Ca^{2+} исходя из K_d , поскольку изменения спектров зонда при связывании с Ca^{2+} определяются в диапазоне концентраций Ca^{2+} от $0,1K_d$ до $10K_d$. Константы K_d зондов quin-2, indo-1 (PE3), fura-2 (PE3), fluo-3 (-4), calcium green-1 (-2) составляют 60–400 нМ, эти зонды имеют высокую аффинность к Ca^{2+} и применяются для регистрации цитозольного уровня ионов кальция ($[\text{Ca}^{2+}]$ – сотни нМ). Для зондов mag-indo, mag-fura, mag-fluo, indo FF, fura FF, fluo FF, calcium green-5N, calcium orange-5N, rhod-5N характерна низкая аффинность связывания с Ca^{2+} (K_d несколько десятков мкМ, у rhod-5N ~300 мкМ), эти зонды разработаны для изучения органелл (митохондрий, ЭПР, где $[\text{Ca}^{2+}]$ – мкМ), с приставкой mag – для регистрации концентрации Mg^{2+} .

Зонды quin, indo, fura имеют максимумы спектров поглощения (возбуждения) в УФ области спектра (от 330 до 360 нм), поэтому для работы с ними желательно использовать кварцевое стекло (кварцевые кюветы, кварцевые линзы в микроскопах). Максимумы спектров испускания излучения у «УФ-зондов» – от 400 до 500 нм (синяя, зеленая флуоресценция). Недостатком работы в УФ-области спектра является то, что это излучение более токсично для клеток, в большей степени рассеивается, а также то, что в этой области будут поглощать излучение природные компоненты биосистем, например, НАДФН, НАДН.

Зонды fluo, calcium green, calcium orange, Oregon green ВАРТА-488, rhod имеют максимумы спектров поглощения 500–560 нм, т.е. возбуждаются излучением видимого диапазона, и испускают излучение с

максимумами в спектрах от 530 до 580 нм (зеленая, желтая, оранжевая флуоресценция). Эти зонды можно использовать для исследований на различном оборудовании, и они более, чем УФ-зонды, подходят для конфокальной лазерной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, для систем с возбуждением аргоновым лазером (488 нм) или твердотельными полупроводниковыми лазерами DPSS (473, 532 нм).

Выделяют группу индикаторов (*ratiometric indicators*), для которых применяется возбуждение или эмиссия на двух длинах волн λ_1 и λ_2 (два канала), характеризующих сдвиг спектра при связывании с Ca^{2+} . Концентрация $[\text{Ca}^{2+}]$ рассчитывается с учетом отношения (*ratio*) интенсивностей флуоресценции F_{λ} , полученных для этих длин волн λ_1 и λ_2 , $R=F_{\lambda_1}/F_{\lambda_2}$. К таким индикаторам относятся indo-1 (регистрация испускания на длинах волн 405 и 485 нм), fura-2 (PE3) (возбуждение на длинах волн 340 и 380 нм). На рисунке 8 в качестве примера показано как определяется $[\text{Ca}^{2+}]$ с использованием indo-1. На рисунке 9 проиллюстрированы различия спектров возбуждения fura-2 (PE3) в несвязанном с Ca^{2+} и связанном с Ca^{2+} состоянии.

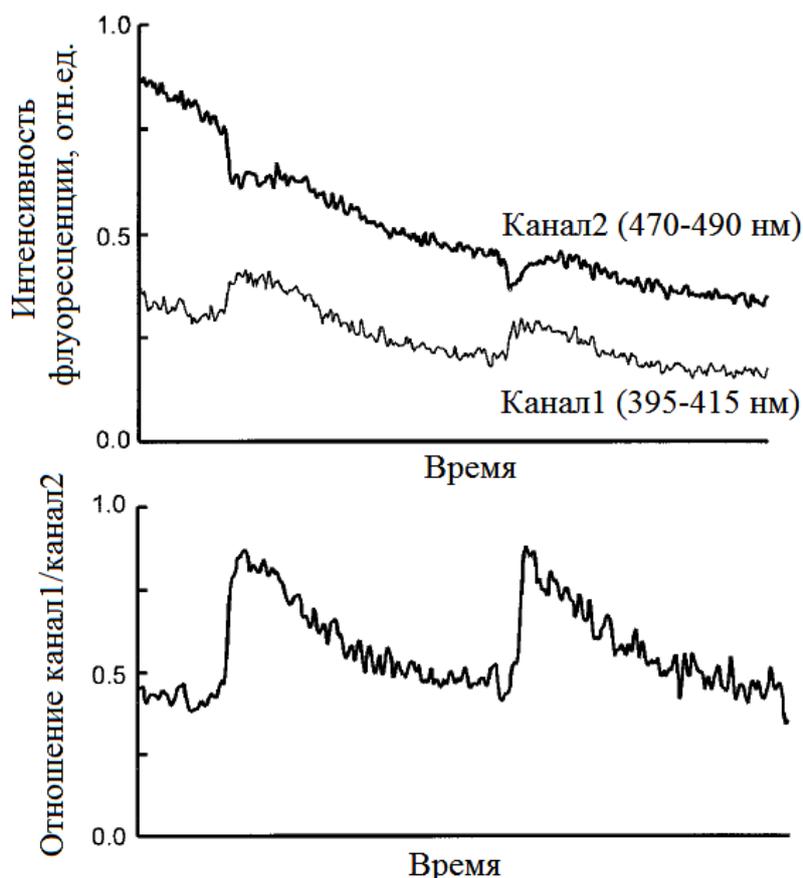


Рисунок 8. Измерение $[\text{Ca}^{2+}]$ с использованием indo-1. Показаны кинетические зависимости интенсивности флуоресценции, измеряемой на двух каналах (длина волны возбуждения в обоих случаях 351 нм), а также рассчитанное отношение $R=F_{\text{канал1}}/F_{\text{канал2}}$, пропорциональное $[\text{Ca}^{2+}]$

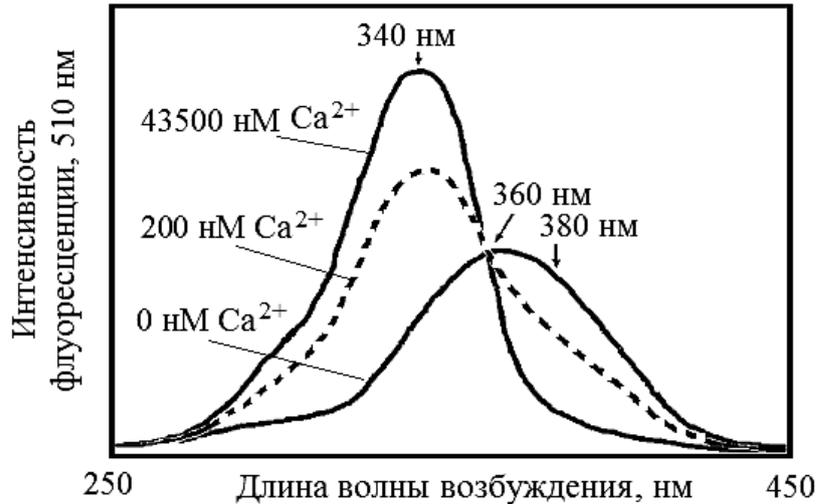


Рисунок 9. Спектры возбуждения fura-2 (PE3) в несвязанном с Ca^{2+} и связанном с Ca^{2+} состоянии. 360 нм – изобестическая точка зонда

Для fluo-3, rhod-2, calcium green class используется одноканальное возбуждение и эмиссия, поскольку при связывании с кальцием положение их спектров не изменяется, а только повышается квантовый выход (десятки, сотни раз).

Важной характеристикой зонда является динамический диапазон, определяемый величинами R_{\max}/R_{\min} для двух-канальных индикаторов и F_{\max}/F_{\min} для одноканальных, где R_{\max} и F_{\max} регистрируются при максимальном насыщении индикатора Ca^{2+} , а R_{\min} и F_{\min} – в отсутствие Ca^{2+} . Чем больше динамический диапазон, тем лучше; у fura-2 (PE3) около 20, indo-1 ~ 20–80, fluo-3 ~ 40–100, fluo-4 характеризуется высоким F_{\max}/F_{\min} более 100.

Концентрация $[\text{Ca}^{2+}]$ рассчитывается для индикаторов с двух-канальной регистрацией по формуле (4) и для одноканальных по формуле (5):

$$[\text{Ca}^{2+}] = \beta \cdot K_d \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \quad (4)$$

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F) \quad (5)$$

где F , $R = F_{\lambda 1} / F_{\lambda 2}$ – экспериментально измеряемые интенсивность флуоресценции и отношение интенсивностей флуоресценции в системе, в которой определяется концентрация $[\text{Ca}^{2+}]$,

β – отношение интенсивностей флуоресценции на длине волны $\lambda 2$ в отсутствие Ca^{2+} и при полном насыщении зонда Ca^{2+} ,

K_d – константа диссоциации,

F_{\max} , R_{\max} – интенсивность флуоресценции и отношение интенсивностей флуоресценции при максимальном насыщении индикатора Ca^{2+} ,

F_{\min} , R_{\min} – тоже в отсутствие Ca^{2+} .

По химическим формам зонды выпускаются в виде кислот, эстеров, конъюгатов с декстраном, и в зависимости от формы зонда процедура его доставки в клетку различается. Декстрановые конъюгаты зондов не способны проникать через мембраны, их доставка в клетку является инвазивной процедурой и включает порирование мембраны с применением неионных детергентов (дигитонин, Плуроник F-127, Triton X-100, Cremophor EL и др.), гипоосмотического шока, с помощью техники пэтч-кламп, микро- и макро- инъекций, и др. Будучи доставленными в цитозоль, декстрановые конъюгаты зондов уже не могут ни проникать во внутриклеточные компартменты, ни выходить из клетки и более точно отражают именно цитозольный уровень ионов Ca^{2+} .

Эстеры индикаторов (помечаются символами AM) проникают через плазматическую мембрану, внутри клетки подвергаются гидролизу эстеразами, после чего не могут вытекать из клетки, но могут подвергаться компартментализации (проникновение в органеллы, ядро). Проблемой является то, что концентрация гидролизованного зонда в цитозоле сильно зависит от ряда факторов (концентрации и типа загружаемого зонда, времени и температуры загрузки, количества и типа клеток, внутриклеточного pH) и может быть на несколько порядков ниже исходной концентрации загружаемого эстера. Эстеры являются неактивными формами зондов. Для определения $[\text{Ca}^{2+}]$ проводят калибровку, которую выполняют с использованием активных форм зондов, не эстеров.

Определение $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле фагоцитов методом флуориметрии с использованием зонда fura-2 (PE3)-AM

Реагенты и оборудование

1. Суспензия фагоцитов (нейтрофилов) в сбалансированном солевом буферном растворе с pH 7,2–7,4 (без Ca^{2+} и Mg^{2+})
2. Активаторы клеток (например, хемотаксический пептид fMLP, форболовый эфир PMA), праймирующие агенты (например, интерферон, интерлейкин 1β , интерлейкин 6, гранулоцит-колониестимулирующий фактор G-CSF), ингибиторы (например, Ca^{2+} -блокаторы верапамил, нифедипин, $\text{La}(\text{NO}_3)_3$)
3. Флуоресцентный зонд на Ca^{2+} (fura-2 AM или fura PE3-AM)
4. Нефлуоресцирующие хелаторы Ca^{2+} (EGTA или EDTA)
5. Детергент (дигитонин или Triton X-100) или кальциевый ионофор (иономицин)

6. Спектрофлуориметр (люминометр), центрифуга (1500 оборотов/мин), кварцевая кювета, дозаторы

Процедура

1. Загрузка зонда. В суспензию фагоцитов (20 млн клеток/мл) добавить зонд в концентрации 2–5 мкМ и проинкубировать 30–45 мин при температуре 22–37 °С для деэстерифицирования и достижения равновесного распределения между связанной и свободной формами молекул зонда внутри клетки.

2. Отмывка от несвязанного зонда. Нагруженные зондом клетки осадить центрифугированием при 1500 оборотов/мин в течение 7 мин. Надосадочную жидкость удалить, к осадку добавить буферный солевой раствор и равномерно перемешать. Хранить на льду.

3. Суспензию клеток разделить на отдельные пробы с содержанием клеток 1–2 млн./мл, добавить в них праймирующие агенты, ингибиторы, перехватчики, CaCl₂.

4. Измерение. В кварцевую кювету поместить суспензию клеток из определенной пробы, добавить магнит для перемешивания, поместить в кюветное отделение и включить регистрацию кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции $F_{\lambda_1}(t)$ и $F_{\lambda_2}(t)$ на длине волны 510 нм (иногда выбирают 500 нм) в двух каналах, соответствующих возбуждению на длинах волн $\lambda_1=340$ нм и $\lambda_1=380$ нм (иногда выбирают 360 и 390 нм). Измерения, как правило, проводятся при температуре 37 °С.

5. Через 1–2 минуты не прекращая измерения внести в кювету стимулятор (например, PMA, fMLP) и провести регистрацию изменений, вызванных активацией клетки и повышением уровня [Ca²⁺] в цитозоле в течение 5–30 минут.

6. В конце измерения для определения F_{\max} и F_{\min} , соответствующих максимальному насыщению зонда Ca²⁺ и отсутствию Ca²⁺, сначала в кювету добавить детергент, разрушающий плазматические мембраны клеток, (0,1 % Triton X-100 или дигитонин 2–100 мкг/мл) или 1 мкМ иономицина и 1 мМ CaCl₂ – получим F_{\max} , затем добавить хелатирующий агент EGTA или EDTA в концентрации 5–8 мМ – получим F_{\min} для $\lambda_1=340$ нм и $\lambda_1=380$ нм.

7. Для построения кинетических зависимостей концентрации [Ca²⁺], провести расчеты согласно формуле (6), соответствующей описанной выше формуле (4), подставляя $R(t)=F_{340}(t)/F_{380}(t)$ и экспериментально полученные F_{\max} и F_{\min} .

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot F_{380\text{min}} / F_{380\text{max}} \cdot (R(t) - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R(t)) \quad (6)$$

Можно воспользоваться данными, приведенным в работе [8], согласно которым K_d составляет 224 нМ для fura-2, 250 нМ для fura PE3-AM.

На рисунках 10, 11 представлены кинетики изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле нейтрофилов, активированных fMLP и PMA, полученные с использованием зонда fura PE3-AM. fMLP индуцирует быстрое повышение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле за счет высвобождения из внутриклеточных депо, что значительно ингибируется нифедипином, но не $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ или веропамилом (см. рисунок 10). При действии на нейтрофилы PMA наблюдается медленное повышение концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле только в присутствии ионов Ca^{2+} во внеклеточной среде, что свидетельствует о потоке Ca^{2+} через плазматическую мембрану. PMA-индуцированный медленный поток Ca^{2+} в цитозоль блокируется нифедипином, $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ и веропамилом (см. рисунок 11).

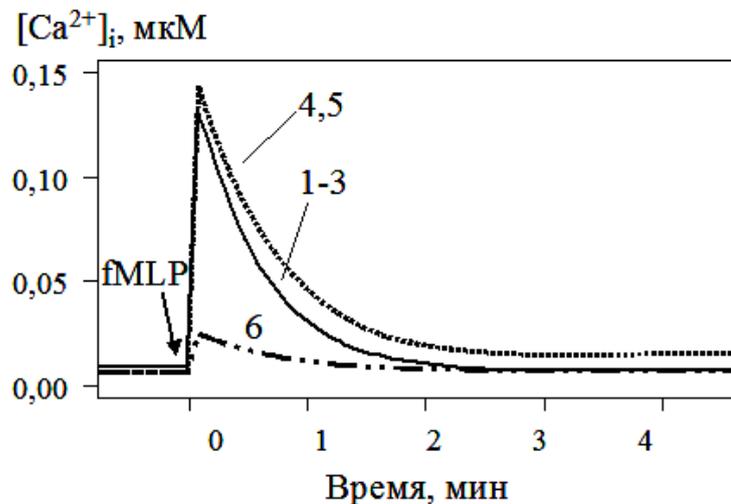


Рисунок 10. Кинетики изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле нейтрофилов, активированных fMLP в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3–6) $0,5 \text{ мМ Ca}^{2+}$ во внеклеточной среде. 1, 4 – без ингибиторов, 2, 3 – при добавлении $10 \text{ мкМ La}(\text{NO}_3)_3$, 5 – 20 мкМ веропамила, 6 – 20 мкМ нифедипина

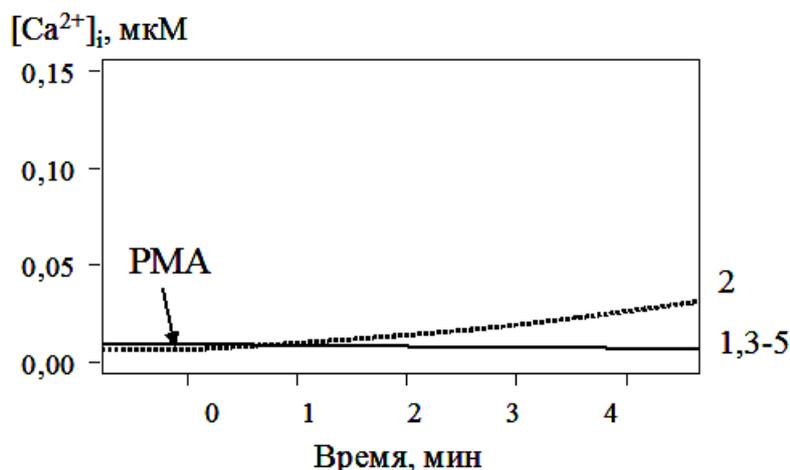


Рисунок 11. Кинетики изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле нейтрофилов, активированных fMLP в отсутствие (1) и в присутствии (2–5)

0,5 мМ Ca^{2+} во внеклеточной среде. 1, 2 – без ингибиторов, 3 – при добавлении 10 мкМ $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, 4 – 20 мкМ веропамила, 5 – 20 мкМ нифедипина

Литература

1. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы общей патологии. Часть I. Основы общей патофизиологии. (Учебное пособие для студентов медВУЗов). СПб. 1999. ЭЛБИ, 624 с.
2. Клюбин И.В., Гамалей И.А. НАДФН-оксидаза – специализированный ферментативный комплекс для образования активных метаболитов кислорода // Цитология, 1997, Т.39, №4,5, С. 320-341
3. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. Внутриклеточная сигнализация. Электронное издательство “Аналитическая микроскопия”, 2003. 84 с.
4. Marcius W.D., Hochmuth R.M. Experimental studies of membrane tethers formed from human neutrophils // Annals Biomed. Engineering, 2002, V.30, P.1273–1280
5. Kennedy A.D., DeLeo F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection // Immunol. Res., 2009, V.43, P.25–61
6. Nüsse O. Biochemistry of the phagosome: the challenge to study a transient organelle // Scient. World J., 2011, V.11, 2364–2381
7. Yan Y., Wei C., Zhang W., Cheng H., Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling // Acta Pharmacol. Sinica, 2006, V.27(7), P.821–826
8. Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J.D., Herman B. Measurement of intracellular calcium // Physiol. Rev., 1999, V.79, P.1089–1125
9. Зубова Н.Н., Савицкий А.П. Молекулярные клеточные сенсоры, созданные на основе цветных флуоресцирующих белков. I. Сенсоры pH, ионов Cl^- , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} // Успехи биол. химии, 2005, Т.45, С.391–454
10. Степаненко О.В., Верхуша В.В., Кузнецова И.М., Туроверов К.К. Флуоресцентные белки: физико-химические свойства и использование в клеточной биологии // Цитология, 2007, Т.49, №5, С.395–420