

УДК 577.3

В.Л.Зима, О.М.Дячок, В.В.Ганчурін

Модифікація методики дослідження вільного внутрішньоклітинного кальцію

Описан микроспектрофлуориметр, который позволяет регистрировать транзистентные Ca^{2+} -сигналы в одно- и двухлучевом режимах, а также измерять спектры флуоресценции (возбуждения) зондов в разных клетках и мышечных тканях, когда исследуется их связывание с ионами кальция, с белками цитоплазмы или изучается изменение рН клетки. На этой установке одновременно с записью флуоресцентного сигнала с помощью тензометрической установки регистрируется изометрическое сокращение мышечных полосок.

Вступ

Іони кальцію є найбільш важливими вторинними посередниками, які несуть інформацію від збудливої клітинної мембрани до різних внутрішньоклітинних структур, активуючи численні клітинні функції: рухомість, секрецію, синтетичні процеси тощо [1, 3, 11]. Застосування Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних зондів (фура-2, індо-1, флуо-3) [6, 8], рН-чутливих зондів [7] здійснило революційний прорив у методичних можливостях при вимірюванні внутрішньоклітинних $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і $[\text{H}^+]_i$, в контролюванні їх змін під час клітинної активності. Традиційні установки для реєстрації Ca^{2+} -транзистентів у нервових і м'язових клітинах вимірюють двоххвильовий флуоресцентний параметр R — відношення інтенсивностей флуоресценції на двох довжинах хвиль (λ_1/λ_2), які виділяються світлофільтрами [2, 5, 6, 9]. Але в спектральному відношенні Ca^{2+} -сигнал більш складний, тому що крім зв'язування флуоресцентних зондів з іонами кальцію ці зонди можуть зв'язуватися з білками цитоплазми, і можуть змінювати свої спектральні характеристики при зміні рН клітини [4, 7, 9, 10, 12]. Це вимагає конструювання більш універсальних установок, на яких можна вимірювати крім інтенсивності флуоресценції на певній довжині хвилі ще й спектральні характеристики кальцієвих індикаторів.

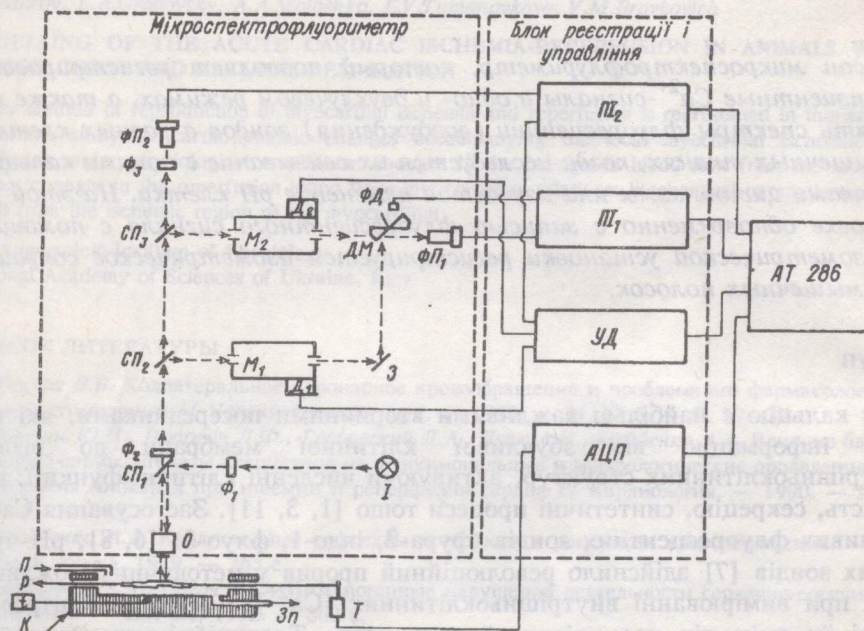
У нашій роботі описана установка, яка дозволяє фіксувати транзистентні Ca^{2+} -сигнали в одно- та двопроменевому режимах, а також реєструвати спектри флуоресценції зондів у різних клітинах і тканинах. На цій установці, одночасно із записом флуоресцентного сигналу, реєструється за допомогою тензометричного пристрою ізометричне скорочення тонких м'язових смужок.

Методика

Оптична частина. Установку змонтовано на базі микроспектрофлуориметра МФТХ-2М фірми «ЛОМО» (Росія), блок-схему якої представлено на мал. 1. Оптична частина включає мікроскоп (об'єктив О, світлороздільні пластини СП₁, СП₂ і СП₃) і монохроматори М₁ і М₂. Розкладання світла в спектр відбувається при повертанні дифракційних ґраток за допомогою ходових двигунів Д₁ і Д₂, робота яких управляється спеціальним блоком УД.

© В.Л.ЗИМА, О.М.ДЯЧОК, В.В.ГАНЧУРИН, 1995

Флуоресценція зондів збуджується від джерела світла 1. Використовуються ртутна лампа ДРШ-250-2 або ксенонова лампа ДКсШ-150, які живляться від стабілізованого джерела струму. Світло флуоресценції реєструється фотопомножувачами ФП₁ і ФП₂ (фотопомножувачі ФЕУ-106). Установа може працювати в одно- і двопробному режимі.



Мал. 1. Блок-схема установки: 1 — джерело світла (ртутна або ксенонова лампа); О — об'єктив мікроскопа; Ф₁, Ф₂ і Ф₃ — світлофільтри; СП₁, СП₂ і СП₃ — світлороздільні пластини; М₁ і М₂ — монохроматори; Д₁ і Д₂ — ходові двигуни; ФП₁ і ФП₂ — фотопомножувачі; ДМ — диск модуляторний; ФД — фотодіод; З — відбивне дзеркало; ПП₁ і ПП₂ — блоки підрахунку фотоімпульсів; УД — блок управління ходовими двигунами; К — камера з м'язовою смужкою; П — подавання в камеру розчинів; Зл — зливання розчинів; Т — механотрон 6МХ1С; t — вимірювання температури терморезистором; Р — зовнішній натяг; АТ 286 — персональна електронно-обчислювальна машина; Ф₂ — запираючий світлофільтр.

В однопробному режимі вимірювали такі флуоресцентні характеристики:

1. Вимірювання інтегральної інтенсивності флуоресценції. У цьому режимі роботи використовували схрещені світлофільтри: Ф₁, який пропускає збуджуюче світло від джерела 1 і Ф₃, який пропускає флуоресценцію, але не пропускає збуджуюче світло. Реєстрацію флуоресценції провадили фотопомножувачем ФП₂, для чого в хід світлових променів вводили світлороздільну пластинку СП₁ і не використовували СП₂ і СП₃.

2. Вимірювання спектрів збудження флуоресценції. Для цього на місці фотопомножувача ФП₁ розміщували ксенонову лампу 1, світло від якої проходило через монохроматор М₂ і за допомогою СП₃ і об'єктива О падало на біологічний об'єкт. Світлороздільні пластинки СП₁ і СП₂ не використовували. Флуоресценцію від об'єкту збирали тим же об'єктивом, і вона проходила через СП₃ і світлофільтр Ф₃, а потім реєстрували фотопомножувачем ФП₂. Автоматичний запис спектру збудження флуоресценції відбувається завдяки включенню ходового двигуна Д₂.

3. Вимірювання спектрів флуоресценції. У цьому режимі застосовували світлороздільні пластинки СП₁ і СП₃. Збуджуюче світло від джерела 1 проходило через світлофільтр Ф₁ і викликало флуоресценцію, яка потім про-

ходила через монохроматор M_2 і реєстрували її фотопомножувачем $ФП_1$. При цьому із світлового пучка виводили лопаті модуляторного диску $ДМ$.

У двопробному режимі використовували два методи реєстрації.

1. У першому способі в світловий пучок вводили $СП_1$, $СП_2$, $СП_3$ і дзеркальний модулятор $ДМ$. Флуоресценція збуджувалася від джерела світла 1 через фільтр $Ф_1$. Флуоресцентне випромінювання λ_1 і λ_2 , яке виділялося двома монохроматорами M_1 і M_2 відповідно вибраним λ_1 і λ_2 , по черзі направлялося за допомогою модуляторного диску $ДМ$ на фотопомножувач $ФП_1$ і вимірювали двохвильовий флуоресцентний параметр R .

Аналіз провадили за спектром флуоресценції. Цей метод краще застосовувати для індо-1.

2. У другому способі реєстрації на місці $ФП_1$ розміщували ксенонову лампу 1, а в світловий пучок вводили $ДМ$, $СП_2$ і $СП_3$, а $СП_1$ виводили. Використовували монохроматори M_1 і M_2 , якими виділяли в спектрі збудження λ_1 і λ_2 . Збуджуюче світло проходило через об'єктив O на біологічний об'єкт, а флуоресценцію від об'єкту реєстрували через $Ф_3$ фотопомножувачем $ФП_2$. Цим методом вимірювали двохвильовий параметр R . Цю реєстрацію краще використовувати для фура-2.

Монохроматичність світла λ_1 і λ_2 — $\Delta\lambda$ — становить 10 нм. Модуляторний диск повертається з частотою 150 Гц, і це дозволяє фіксувати параметр R для достатньо швидких процесів (перший вимір отримували через 6,6 мс).

Використання кварцевих об'єктивів $58 \times 0,8$ (водяна імерсія) і $10 \times 0,2$ (повітря) дозволяє без значних втрат збуджувати флуоресценцію біологічних об'єктів. Для підвищення чутливості установки і зменшення шумів фотопомножувачі працюють у квантометричному режимі. Фотоімпульси від фотопомножувачів записували пристроями підрахунку імпульсів $П_1$ і $П_2$, які являють собою інтерфейсні плати для ІВМ-сумісної персональної електронно-обчислювальної машини (ПЕОМ) АТ 286.

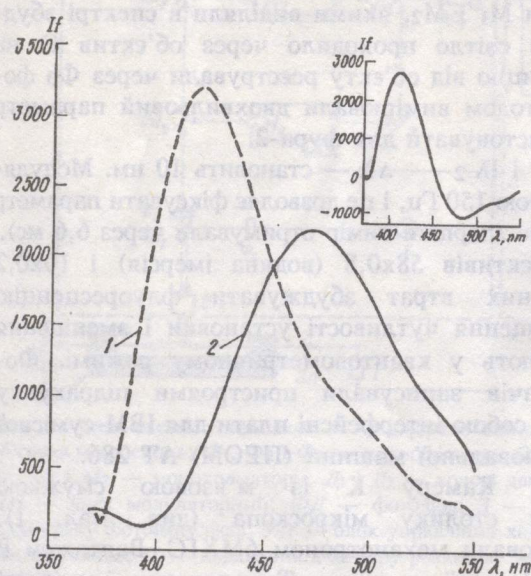
Тензометричний пристрій. Камеру K із м'язовою смужкою розміщували на предметному столику мікроскопа (див. мал. 1). Ізометричне напруження вимірювали механотроном 6MX1C. Вантажем P задавали початковий натяг м'язової смужки. Температуру в камері вимірювали терморезистором. Введення в ПЕОМ аналогових сигналів, які реєстрували в досліді (тензометричну силу, температуру), здійснювали завдяки аналогово-цифровому перетворювачу (АЦП). Синхронізацію роботи пристроїв для підрахунку фотоімпульсів, ходових двигунів і АЦП провадили комутуючими сигналами частотою 150 Гц від фотодіоду $ФД$. Розроблене програмне забезпечення дозволяє вимірювати і відображати оптичні та тензометричні сигнали для будь-якого з режимів роботи установки. Отриману інформацію записували та зберігали в ASCII кодах і опрацьовували з використанням комерційного програмного забезпечення.

Результати

З метою вивчення спектральних характеристик флуоресцентних зондів при різних концентраціях іонів кальцію або при зміні параметрів середовища здійснено модельні дослідження з індо-1. На мал. 2 наведено спектри флуоресценції індо-1 в однопробному режимі, які реєструвалися в розчині з рН 8,0. Це зумовлено тим, що при рН менше ніж 7,5 існує протонна форма індо-1, яка має інші спектральні характеристики, ніж кальцій-вільна форма [4]. Різницеви́й спектр флуоресценції індо-1 (див. вставку на мал. 2), який отримували відніманням спектру 2 від спектру 1, дозволив нам

вибрати довжину хвилі 410 нм, на якій спостерігаються максимальні зміни інтенсивності флуоресценції індо-1 при зміні концентрації вільного кальцію у випадку однохвильової реєстрації.

При двопробовій реєстрації Ca^{2+} -сигналу, коли вводяться світлороздільні пластинки СП₂ («блакитна» — відбиває збуджуючий світловий потік з довжиною хвилі меншою ніж 370 нм та пропускає флуоресценцію більше ніж 370 нм) і СП₃ («зелена» — відбиває випромінювання менше як 430 нм у монохроматор М₁ і пропускає випромінювання більше, ніж 430), спектри флуоресценції індо-1, які наведено на мал. 2, значно трансформуються завдяки спектральним властивостям цих пластинок. Це вимагає коректного вибору λ_1 і λ_2 на монохроматорах М₁ і М₂. Аналіз трансформації спектрів дозволив нам вибрати такі довжини хвиль: λ_1 — 405 нм і λ_2 — 500 нм.



Мал. 2. Спектри флуоресценції індо-1: 1 — в присутності Ca^{2+} , 2 ммоль/л; 2 — у відсутності Ca^{2+} , 2 ммоль/л EGTA. I_f — інтенсивність флуоресценції у відносних одиницях; $\lambda_{\text{об}}$ 344 нм; рН 8,0; t — 20 °С. Вставка: різницевий спектр флуоресценції індо-1 між спектром 1 і спектром 2, ΔI_f — різниця інтенсивності флуоресценції.

Збудження флуоресценції індо-1 здійснювали через фільтр Ф₁ з λ_{344} нм.

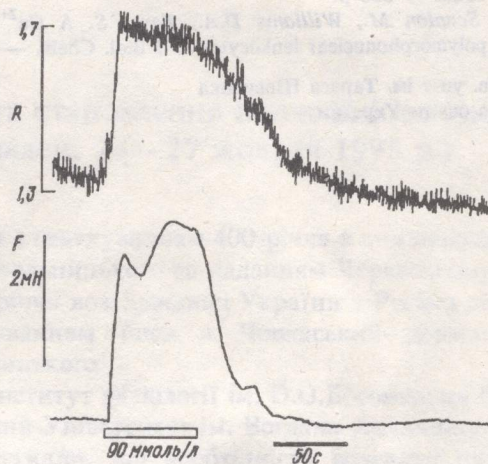
Реєстрацію Ca^{2+} -сигналу проведено в двохвильовому режимі. На мал. 3 представлено транзйентний Ca^{2+} -сигнал та ізометричну силу м'язової смужки *saesit* у відповідь на K^+ -деполяризацію. Слід зазначити, що Ca^{2+} -сигнал випереджає ізометричну силу на 1 с і має складну форму: відразу спостерігається швидке підвищення концентрації вільного кальцію $[\text{Ca}^{2+}]_i$, якому відповідає фазне скорочення *saesit*. Після повільного спаду Ca^{2+} -сигналу спостерігається фаза невеликого повторного наростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$, якому відповідає тривале тоничне скорочення смужки *saesit*.

Проведено калібрування флуоресценції індо-1 *in vivo* для гладенько-м'язових смужок після додавання 50 мкмоль/л дігітоніну або 50 мкмоль/л іономіцину і отримано R_{max} , яке становило $2,4 \pm 0,4$ ($n=6$), у без-

Досліди проведено на тонких гладеньком'язових смужках *saesit* морської свинки (довжина 3 мм, ширина 1 мм і товщина 200 мкм). Навантаження м'язових смужок флуоресцентним зондом індо-1/АМ (5 мкмоль/л) проводили при 36 °С протягом 1 год у розчині Кребса з додаванням Pluronic F-127 (0,05 %). Потім м'язові смужки тричі відмивали свіжим розчином Кребса від індо-1/АМ, який не проник у клітини. Смужки закріплювали в камері К об'ємом 350 мкл. Один кінець м'язової смужки приєднувався до стержня механотрону, а до другого кінця приєднувався вантаж Р для створення початкового натягу м'язу. Попередньо прокالیбрований механотрон вимірював розвиток ізометричної сили в ньютонках (Н).

кальцієвому розчині (після додавання 10 ммоль EGTA) $R_{\min}$ становило $1,22 \pm 0,11$ ($n=6$); β — $1,25 \pm 0,10$ ($n=6$). Концентрація вільного кальцію в м'язових клітинах визначається, як описано в праці Grynkiewicz та співавт. [6].

Мал. 3. Ca^{2+} -сигнал та ізометрична сила тонкої смужки *saecit* у відповідь на K^+ -деполяризацію. R — двохвильовий флуоресцентний параметр; F — ізометрична сила. Розчин Кребса (ммоль/л): NaCl — 135; KCl — 5,9; CaCl_2 — 2,5; MgCl_2 — 1,2; глюкоза — 11,5. pH 7,4; t — 20 °C; λ_{ex} — 344 нм.



Отримані результати свідчать, що сконструйована установка дозволяє в динаміці реєструвати Ca^{2+} -сигнал від тканин. Крім того, на ній можна вимірювати спектральні характеристики флуоресцентних зондів, коли вивчається їх зв'язування з білками цитоплазми або вивчається зміна pH.

V.L.Zima, O.M.Dyachok, V.V.Ganchurin

MODIFICATION OF THE METHODS FOR INVESTIGATION OF INTRACELLULAR FREE CALCIUM

A microspectrofluorimeter which permits recording excitation and emission spectra of fluorescent dyes (fura-2, indo-1) and measuring Ca^{2+} -transients in different cells and smooth muscle strips is described. One-beam and two-beam approaches of recording of spectral characteristic of fluorescent dyes are presented.

Taras Shevchenko University,
Ministry of Education of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костюк П.Г. Кальций и его клеточная возбудимость. — М.: Наука, 1986. — 255 с.
2. Орлов С.Н., Лабас Ю.А. Концентрация свободного кальция в цитоплазме: методы регистрации, distortions и артефакты // Биол. мембраны. — 1989. — 6, № 9. — С. 901—938.
3. Шуба М.Ф. Синаптическая передача в м'язах і механізм дії медіаторів // Вісн. АН УРСР. — 1977. — № 12. — С. 44—56.
4. Bancel F., Salmon J.-M., Vigo J., Viollet P. Microspectrofluorimetry as a tool for investigation of non-calcium interactions of indo-1 // Cell Calcium. — 1992. — 13, № 1. — P. 59—68.
5. Cobbold P.H., Rink T.J. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium // Biochem. J. — 1987. — 248, № 2. — P. 313—328.
6. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // J.Biol. Chem. — 1985. — 260, № 6. — P. 3440—3450.
7. Lattanzio F. The effects of pH and temperature on fluorescent calcium indicators as determined with chelex-100 and EDTA buffer system // Biochem. and Biophys. Res. Commun. — 1990. — 171, № 1. — P. 102—108.
8. Minta A., Kao J.P.Y., Tsien R.Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores // J.Biol.Chem. — 1989. — 264, № 14. — P. 8171—8178.

9. Moore E.D.W., Becker P.L., Fogarty K.E., Williams D.A., Fay F.S. Ca^{2+} imaging in single living cells: Theoretical and practical issues // *Cell Calcium*. — 1990. — 11, № 1. — P. 157—179.
10. Owen C.S., Syces N.L., Shuler P.L., Ost D. Non-calcium environmental sensitivity of intracellular indo-1 // *Anal. Biochem.* — 1991. — 192, № 1. — P. 142—148.
11. Ruegg J.C. Calcium in muscle activation: A comparative approach. — Berlin: Springer-Verlag, 1989. — 300 p.
12. Scanlon M., Williams D.A., Fay F.S. A Ca^{2+} -insensitive form of fura-2 associated with polymorphonuclear leukocytes // *J.Biol. Chem.* — 1987. — 262, № 13. — P. 6308—6312.

Київ. ун-т ім. Тараса Шевченка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 14.03.94