
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ ПОТОКИ В ВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ

Поступил 10.02.16

Одной из важнейших задач современной клеточной биологии является определение не только концентраций различных внутриклеточных ионов, в частности кальция, но и динамики изменений этих параметров. Определение концентраций кальция внутри клетки или даже ее отдельных органелл возможно с использованием нескольких экспериментальных подходов – электронной микроскопии, электрофизиологических методик, флуоресцентно-оптических методов и ряда других. Кальций в клетке находится в свободном (ионизированном) и связанном состоянии. Локальные быстрые изменения уровня Ca^{2+} в определенных локусах являются индивидуальными квантами интегрального осцилляторного кальциевого сигнала, определяющего многие функции клетки. Разделение кальциевых потоков в различных клеточных компартментах и выяснение роли тех или иных кальциевых рецепторов и каналов в плазматической мембране и мембранах внутриклеточных органелл позволяет подойти к определению вклада соответствующих событий в регуляцию физиологических функций клетки, например синаптической пластичности нейрона. В данном обзоре описаны методические подходы для определения концентрации кальция и величины его потоков, что позволяет охарактеризовать отдельные компоненты кальциевой сигнализации и выявить их роль в регуляции различных функций возбудимых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Ca^{2+} , кальциевый поток, флуоресцентный индикатор, микроскопия, нейрон.

ВВЕДЕНИЕ

Кальций является важнейшим сигнальным ионом, и изменения его концентрации обеспечивают регуляцию многочисленных клеточных процессов (возбуждения, мышечного сокращения, высвобождения медиаторов, синаптической пластичности, экспрессии генов, апоптоза). Характеристики кальциевых сигналов определяются функционированием сложного комплекса молекулярных механизмов – ионных каналов, кальцийсвязывающих белков, каналов высвобождения кальция из внутриклеточных депо, а также обменников (или помп), обеспечивающих вывод кальция из цитозоля клетки. В передаче кальциевых сигналов существенную роль играют внутриклеточные структуры, ответственные за перемещение ионов Ca^{2+} . В возбудимых клетках (нервных, мышечных и секреторных)

вызванный деполяризацией вход кальция вызывает дополнительное увеличение концентрации его ионов за счет высвобождения из кальциевых депо, что оказывает регулирующее воздействие на соответствующие клеточные функции как локально, так и в клетке в целом [1, 2]. В наиболее общем виде кальций часто рассматривается как агент, действующий на внутриклеточные процессы путем изменения внутриклеточной концентрации ионной формы этого элемента ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) – уровня свободного кальция. Этот показатель изменяется от 50 нМ в состоянии покоя до порядка 10 мкМ на пиках ряда физиологических сигналов [3]. В процессе реализации различных физиологических процессов и после стимуляции разной природы происходят кратковременные (транзистентные) существенные повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Вход Ca^{2+} из внеклеточной среды осуществляется при активации потенциалуправляемых кальциевых каналов (voltage-gated Ca^{2+} channels, VGCC), каналов ионотропных глутаматных (NMDA) и аце-

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: slava@biph.kiev.ua (В. М. Шкрыль).

тихолиновых рецепторов, а также каналов транзисторного рецепторного потенциала (TRPV-каналов) плазматической мембраны. Основной внутриклеточной структурой, которая воспринимает и обрабатывает кальциевые сигналы, поступающие от кальциевых каналов плазматической мембраны, является эндоплазматический ретикулум (ЭР); соответствующая структура в мышечных волокнах обозначается как саркоплазматический ретикулум (СР). Высвобождение кальция из внутриклеточных депо имеет вид осцилляций и зависит от активности каналов в мембранах кальцийсвязывающих клеточных органелл (ЭР или СР, митохондрий, аппарата Гольджи, ядра). Дополнительное увеличение цитозольной концентрации кальция посредством выброса из ЭР/СР происходит за счет открывания каналов инозитол-3-фосфатных рецепторов (IP_3R) и/или рианодиновых рецепторов (RyR). Этот процесс можно разделить на два этапа. Первым является опосредованное RyR или IP_3R локальное высвобождение кальция из ЭР/СР, вызванное быстрым входом ионов кальция через VGCC или NMDA-рецепторы плазматической мембраны. Второй этап соответствует процессу распространения кальциевого сигнала по всей клетке при активации соседних каналов (например, RyR) под действием самого диффундирующего кальция. Это приводит к более глобальным эффектам – увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в пределах всей клетки или отдельных клеточных компартментов [4].

В клетке различают три пула кальция – пулы свободного (или ионизированного) кальция (Ca^{2+}), хелатированного (связанного с белками) и внутриорганельного кальция. Иногда используется и такое понятие, как концентрация общего кальция (т. е. свободного и связанного).

Важно отметить, что кальций, поступающий в клетку или высвобождающийся из кальциевых депо, интенсивно связывается с цитозольными белками, такими как тропонин, парвальбумин, кальмодулин, кальретинин, кальцийнейрин и другими. Существенной буферной емкостью в отношении кальция обладает также АТФ, способный связывать значительное количество его ионов. В клеточные органеллы (ЭР или СР) кальций поступает за счет активности сарко/эндоплазматической АТФазы (SERCA), на что расходуется энергия, получаемая при гидролизе АТФ. Внутри органелл кальций может также связываться с буферными белками – кальсеквестрином и кальретикулином. Дополнительным важным механизмом, поддерживающим

низкие значения $[Ca^{2+}]_i$, является натрий-кальциевый обменник, который выводит ионы Ca^{2+} из цитоплазмы, используя энергию натриевого электрохимического градиента.

Поскольку кальциевые сигналы на периферии и в центре клетки (или внутри клеточных органелл) могут значительно различаться, то очень важно не только определять концентрацию кальция в том или ином локусе, но и выяснять пространственные и временные характеристики соответствующих изменений данной величины. При этом необходимо не только разделять кальциевый сигнал на потоки кальция, идущие между различными клеточными компартментами, но и определять характеристики указанных потоков.

Сначала опишем методические подходы, которые позволяют определять концентрацию Ca^{2+} внутри клетки в целом или в отдельных клеточных органеллах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ $[Ca^{2+}]_i$ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Электронная микроскопия (ЭМ) с использованием волно- и/или энергодисперсионных приставок позволяет устанавливать концентрацию иона в определенном локусе посредством рентгено-спектрального анализа. В основу рентгеновского микроанализа элементов положена физическая закономерность, заключающаяся в том, что при бомбардировании объекта электронным лучом длина волны и интенсивность возникающего рентгеновского излучения определяются атомным номером и электронной структурой атомов. Под действием упомянутого облучения происходит удаление электронов из внутренних оболочек атома. Электроны из внешних оболочек «перескакивают» на вакантные места, высвобождая избыточную энергию в виде кванта рентгеновского излучения или передавая такую энергию другому электрону из внешних оболочек. По значениям энергии и количеству испущенных в ходе таких процессов квантов судят о количественном и качественном составе анализируемого вещества. Количественный анализ проводится путем сравнения числа испущенных квантов рентгеновского излучения с таковым от эталонного образца (определенного материала). ЭМ дает статичную картину (при этом отсутствует временное разрешение), но описанный подход все же позволяет регистрировать изменения, сопутствующие тем

или иным физиологическим процессам. Это может обеспечиваться посредством быстрой криофиксации исследуемого материала. Одним из ограниченный описанного метода является то, что в данном случае определяется концентрация общего Ca^{2+} , а не свободного или связанного. Существуют несколько вариаций указанного метода.

Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭРС) является методом элементного анализа вещества, базирующимся на определении энергии эмиссии его рентгеновского спектра. В основу дисперсионного метода положено измерение длин волн и интенсивности излучения с использованием спектрометра. В качестве эталонного датчика рентгеновского излучения используют кристалл-анализатор (слюда, кварц, фтористый литий), с помощью которого можно выявить характерное излучение весьма большого количества элементов – от натрия до урана. Это позволяет количественно определять общую концентрацию Ca^{2+} и других ионов (например, Na^+ и K^+) и их распределение в клеточных компартментах [5–9].

Средняя величина общей концентрации кальция внутри ЭР нейронов ЦНС, определенная с помощью данного метода, составляла 5.1 ± 1.1 ммоль/кг сухого веса, или же 1.3 ± 0.3 мМ (если считать, что содержание воды составляет 85 %) [10]. После раздражения пачкой высокочастотных стимулов концентрация Ca^{2+} внутри ЭР подобных клеток увеличивалась до 3.7 мМ [10]. Усредненное значение общей концентрации кальция в цитозоле равнялось 0.7 ммоль/кг сухого веса, что соответствует 120 мкМ [8]. Как известно, концентрация свободного Ca^{2+} в большинстве нейронов в состоянии покоя составляет около 100 нМ [3]. Согласно этим данным можно получить отношение концентрации общего кальция к концентрации свободного – порядка 1200. В активном состоянии клетки (т. е. после интенсивной стимуляции), когда уровень свободного Ca^{2+} увеличивается до 1 мкМ, а содержание общего цитозольного кальция до 0.8 мМ [10], данное соотношение составляет 800. Сопоставимые значения были получены и в других исследованиях. Так, указывалось, что соотношение связанного и свободного кальция составляет около 1000 [11], хотя эта величина не является постоянной. Таким образом, определив содержание общего кальция при помощи ЭРС, можно примерно оценить концентрацию свободного кальция (разделив первый показатель на коэффициент 10^3).

Другим подходом является *спектроскопия энергетических потерь электронов* [12]. Эта методика в три-четыре раза более чувствительна по сравнению с ЭРС; она позволяет оценивать уровни кальция в пределах от 0.2 до 20 мМ [13] и обеспечивает лучшее пространственное разрешение.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЕГО РАДИОАКТИВНОГО ИЗОТОПА

Концентрация кальция внутри клетки или даже в отдельных органеллах может быть определена посредством измерения активности его радиоактивного изотопа – ^{45}Ca . Анализ кинетики поглощения ^{45}Ca или кривых десатурации позволяет получать информацию о распределении данного элемента в различных клеточных компартментах и определять скорость его перераспределения между такими компартментами. Подобные исследования должны производиться в стационарных состояниях. Определение быстрых изменений кальциевого потока при входе или выходе кальция из клетки по данному методу может быть произведено посредством фракционного анализа. В этом случае возможно определить амплитуду и кинетические параметры кальциевого сигнала, но из-за временных ограничений метода актуальную скорость потока кальция установить не удастся [14, 15]. При использовании указанного метода также присутствует ошибка, связанная с трудностью определения конкретного компартмента, в котором происходят изменения уровня кальция; невозможность точно идентифицировать анатомическую структуру объекта заметно ограничивает возможности соответствующих определений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАЛЬЦИЙЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЭЛЕКТРОДА

Концентрация свободного кальция в клетке может быть измерена потенциометрически с применением кальцийчувствительного электрода. Чувствительность таких электродов лежит в диапазоне 1 нМ – 100 мМ. Данный метод очень удобен для определения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в стационарных условиях, на-

пример в растворах для калибровки. Поскольку время реакции электрода на изменения $[Ca^{2+}]_i$ соответствует примерно 1 с, то и этот метод не может быть использован для исследования быстрых изменений концентрации кальция. Конструктивно кальцийчувствительный электрод в общем виде включает в себя липофильную мембрану, разделяющую два водных отсека. В одном из них находится эталонный раствор с известной концентрацией Ca^{2+} , а в другой – исследуемый раствор. Из последнего раствора ионы кальция попадают в другой отсек (эталонный), что приводит к появлению потенциала на мембране, пропорционального разнице концентраций. Величина его может быть рассчитана по уравнению Нернста: $\Delta V = 28 \log(c / c_{ref})$, где ΔV – разность потенциалов, c_{ref} – концентрация Ca^{2+} в эталонном растворе, а c – данный параметр в исследуемом растворе [16]. Кальцийчувствительный электрод может быть конструктивно выполнен как микроэлектрод с толщиной кончика 0.5–10 мкм. Отрицательным аспектом свойств такого микроэлектрода является наличие значительно шума, наложенного на полезный сигнал; кроме того, существуют заметные проблемы с калибровкой [17].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ $[Ca^{2+}]_i$ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ ПЭТЧ-КЛЭМП

Ток, обусловленный проходом иона через канал плазматической мембраны, может быть измерен с применением метода пэтч-клэмп, т. е. фиксации потенциала на микроучастке мембраны и регистрации тока. Если при этом известна величина тока, то локальная концентрация кальция может быть рассчитана как $\int 1/c_f \cdot I_{Ca} \cdot dt$, где c_f – константа Фарадея, а I_{Ca} – ток через кальциевые каналы клетки. Данный подход был использован для калибровки кальцийчувствительного флуоресцентного индикатора. При этом в миоцитах желудочка миокарда посредством электрофизиологических измерений величины кальциевого тока через одиночный кальциевый канал L-типа был откалиброван флуоресцентный индикатор Fluo-4, что позволило получить точные значения величины миниатюрного кальциевого сигнала с применением конфокального сканирующего микроскопа [18]. Низкоаффинный

кальциевый индикатор может использоваться для оптического измерения кальциевого тока в пресинаптическом бутоне; это было продемонстрировано при сравнении величин оптического сигнала и протекающего тока [19].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ $[Ca^{2+}]_i$ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Если для исследования кальциевой сигнализации в клетке необходимо высокое временное разрешение, применяются флуоресцентный микроскоп и кальциевые флуоресцентные индикаторы. При этом можно использовать обычный флуоресцентный микроскоп, оборудованный фотоэлектронным умножителем или CCD-камерой, или же высокоскоростной сканирующий конфокальный микроскоп.

Флуоресцентный метод не позволяет получить прямую величину $[Ca^{2+}]_i$, а отображает то количество ионов кальция, которое связывается с красителем. Концентрация свободного Ca^{2+} рассчитывается по величине интенсивности флуоресценции красителя по приведенной ниже формуле. С использованием привязки измеряемого сигнала к области высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточного депо или месту входа этого иона через плазматическую мембрану можно определить динамику свободного Ca^{2+} и величину кальциевого потока в отдельных компартментах нейрона. При вычислении $[Ca^{2+}]_i$ необходимо учитывать и «побочные» кальциевые потоки (не связанные с реакцией с красителем) посредством введения в расчеты дополнительного дифференциального компонента.

Уравнение расчета свободной концентрации кальция для одноволнового метода возбуждения красителя с учетом упомянутого дополнительного дифференциального компонента выглядит следующим образом:

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{1}{k_{on}} \cdot \frac{d[Ca:dye]}{dt} + K_D \cdot [Ca:dye] \quad (1)$$

где $[dye]$ – концентрация красителя; $[Ca:dye]$ – концентрация красителя, связанного с кальцием; K_D – константа диссоциации красителя, k_{on} – коэффициент связывания кальция с красителем. Необходимо

также учесть процесс диффузии молекул красителя из области регистрации. При этом уравнение 1 примет следующий вид:

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{1}{k_{on}} \cdot \frac{d[Ca:dye]}{dt} - D \cdot \Delta[Ca:dye] + K_D \cdot [Ca:dye] \quad (2)$$

где D – коэффициент диффузии красителя, Δ – векторный дифференциальный оператор.

Выражение, описывающее флуоресцентный сигнал, выглядит следующим образом:

$$F = \frac{[Ca:dye] \cdot F_{max}}{[dye]} + \frac{([dye] - [Ca:dye]) \cdot F_{min}}{[dye]}, \quad (3)$$

где F_{max} и F_{min} соответствуют максимальной и минимальной интенсивностям флуоресценции, определяемым при калибровке красителя, а $[Ca:dye]$ фактически соответствует величине флуоресцентного сигнала F . Тогда уравнение для определения свободной концентрации кальция соответственно интенсивности флуоресценции красителя можно записать так:

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{\frac{dF}{dt} - D \cdot \Delta F + (F - F_{min})k_{off}}{(F_{max} - F) \cdot k_{on}}, \quad (4)$$

где F – текущая интенсивность флуоресценции. Используя уравнение 4, можно определить концентрацию свободного кальция в растворе по изменению флуоресценции кальциевого зонда, например в случае применения Fluo-4.

При физиологических стимулах кальциевый сигнал изменяется транзитивно, поэтому важно оценить не только абсолютную величину концентрации свободного Ca^{2+} , но и динамику ее изменений. Последнее достигается определением величины и скорости потока для кальциевого сигнала в конкретных областях клетки, например в зоне канала или кальциевого депо.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ КАЛЬЦИЕВОГО ПОТОКА

Основной количественной характеристикой, используемой для описания изменений концентрации иона, например при его переносе через мембрану, является поток. Поток ионов Φ через площадь S измеряется количеством частиц, которые пересекают эту площадь за единицу времени. Вычис-

ление величины потока фактически сводится к нахождению первой производной кальциевого сигнала по времени. Для определения временных характеристик и амплитуды потока Ca^{2+} при высвобождении данных ионов из внутриклеточных депо было предложено несколько подходов [20–25]. Основная сложность заключается в том, что в данном случае нужно вычислить несколько параметров и не только определить величину концентрации свободного кальция, но и произвести вычисления концентраций кальция, связанного с органеллами и эндогенными буферами, а также установить количество кальция, выводимого из клетки. Для этого необходимо задать систему нелинейных дифференциальных уравнений с известной величиной концентрации свободного кальция и учетом каждого процесса, участвующего в изменении $[Ca^{2+}]_i$. Кинетические параметры для кальцийчувствительных компонентов клетки могут быть выяснены в ходе дополнительных экспериментов или определены при анализе кальциевого сигнала.

В самом простом случае, когда отсутствует буферная емкость, кальциевый поток можно рассчитать по простой формуле: $\Phi = \frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt}$. При таких

расчетах Брам и соавт. впервые использовали в 1988 г. термин «входной поток» и показали, что в скелетной мышце он равняется «поток высвобождения» [21]. Однако данное условие не выполняется в других клетках – кардиомиоцитах, волокнах гладких мышц и нейронах, поэтому более правильным будет использование термина «поглощение»:

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \text{поток} - \text{поглощение}. \quad (5)$$

Существовало два способа расчета «поглощения» – теоретический, основанный на известных значениях потока Ca^{2+} [26], и эмпирический [27]. Брам и соавт. объединили эти два метода в один, который и применяется в настоящее время. Блаттер и соавт. использовали оригинальный метод анализа кальциевого макросигнала, зарегистрированного в клетке [24, 26, 27], и адаптировали его для анализа локальных кальциевых микросигналов в кардиомиоцитах при высвобождении кальция из СР.

В ходе расчета величины потока кальция необходимо точно задать буферные компоненты, такие как связывание с цитоплазматическими белками (например, тропонином), АТФ и ЭГТА, захват кальция митохондриями, вклад SERCA, вывод Ca^{2+} из клетки [28].

Уравнения изменения концентрации кальция ($[Ca^{2+}]$) для нескольких буферных систем (B_i) с учетом диффузии будут выглядеть следующим образом:

$$\frac{[Ca^{2+}]}{dt} = D_{Ca^{2+}} \cdot \Delta[Ca : dye] + \Phi - \sum_i ([Ca^{2+}] \cdot [B_i] \cdot k_{on}^i + [Ca : B_i] \cdot k_{off}^i) \quad (6)$$

$$\frac{[Ca : B_i]}{dt} = D_{Ca^{2+}} \cdot \Delta[Ca : dye] + \sum_i ([Ca^{2+}] \cdot [B_i] \cdot k_{on}^i - [Ca : B_i] \cdot k_{off}^i) \quad (7)$$

$$\frac{[B_i]}{dt} = D_{B_i} \cdot \Delta[B_i] - \sum_i ([Ca^{2+}] \cdot [B_i] \cdot k_{on}^i + [Ca : B_i] \cdot k_{off}^i), \quad (8)$$

где D – соответствующий коэффициент диффузии, B_i представляет различные кальцийсвязывающие буферные компоненты, $[Ca : B]$ – концентрация кальция, связанного с буфером, k_{on} и k_{off} – коэффициенты связывания с заданным буфером и отсоединения ионов кальция от него. Если коэффициент диффузии для $[Ca : B]$ и $[B]$ одинаков, то $[B]$ является константой и, соответственно, последнее уравнение 8 можно исключить. Решая систему этих уравнений для выбранных кальцийсвязывающих компонентов (концентрации кальция вычисляются по уравнению 4), можно определить величину кальциевого потока Φ .

Ошибка перерасчета кальциевого потока. Процесс реконструкции скорости потока первоначально был разработан для одномерного конфокального сканирования (режимы $x-t$ или $y-t$) кальциевого сигнала в приближении радиальной симметрии. В случае сканирования в двумерном пространстве ($x-y-t$) перерасчет потока кальция усложняется ввиду отсутствия радиальной симметрии и существующих ограничений в аксиальной плоскости z , для которой полная информация о кальциевом сигнале отсутствует. Ошибка может быть оценена посредством симуляции заданного потока кальция при определенных экспериментальных условиях. Так, в случае симуляции заданного кальциевого сигнала с вертикальным разрешением 1 мкм (что соизмеримо с конфокальным разрешением z в аксиальном направлении) ошибка соответствовала 20 % заданного потока кальция [29]. Таким образом, регистрация в координатах $x-y-t$ и перерасчет кальциевого сигнала на величину потока имеют систематическую ошибку недооценки около 20 %. Для описания физиологических процессов, связанных с изменениями $[Ca^{2+}]_i$ в клетке, подобная ситуация, однако, может быть приемлема.

Пример расчета потока кальция при открывании группы каналов RyR. Величина потока кальция была подробно описана при исследовании сопряже-

ния возбуждения и сокращения в кардиомиоцитах миокарда. Первоначально кальций входит в клетку через VGCC L-типа. Это, в свою очередь, вызывает дополнительное увеличение концентрации Ca^{2+} за счет активации RyR и высвобождения кальция из внутриклеточных депо. Единичные дискретные события высвобождения Ca^{2+} при открывании RyR были визуализированы с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии и названы «кальциевыми вспышками» (sparks; более точный перевод – «искры», но в литературе был принят первый из этих терминов) [30, 31]. Такие вспышки отражают активацию нескольких RyR в CP (или ЭР) и соответствуют индивидуальным блокам (квантам) интегрального кальциевого сигнала. Флуоресценция зонда при таких вспышках остается локальной, что может быть хорошим объектом для описания и определения потоков кальция. Подобные события входа кальция, но опосредованные каналами IP_3R , получили название паффы (puffs, в переводе «дуновения»); в литературе используется англоязычный термин); эти кальциевые события впервые были обнаружены в ооцитах *Xenopus* [32]. IP_3R могут активироваться с повышением уровня кальция не только за счет ионов, вышедших через канал этих рецепторов, но и за счет дополнительной модуляции тем кальцием, который находится в цитозоле непосредственно около рецептора. При более глобальном высвобождении Ca^{2+} локальные сигналы сливаются и могут распространяться по цитозолу как самоподдерживающаяся волна.

Вышеописанный метод расчета потока кальция в ходе его высвобождения из внутриклеточного депо требует определения концентраций и кинетических параметров связывания кальция с определенными молекулами и систем вывода кальция [33, 34]. Из семи основных процессов, модулирующих кальциевую вспышку, основными являются реакция связывания Ca^{2+} с АТФ и диффузия этого иона из исследуемой области. Вклад других буферных процессов, таких как (в порядке уменьшения значимости) связывание Ca^{2+} с красителем-зондом, ЭГТА, SERCA и тропонином, а также активность натрий-кальциевого обменника сарколеммы, не превышает 10 % [34]. Вычисленная максимальная плотность потока (на пике кальциевой вспышки) составляла 53 мМ/с, что эквивалентно 11 пА протекающего тока. С использованием этих значений было рассчитано количество открытых каналов RyR. Полученная оценка составляла 20–30 (если значение тока через одиночный канал равнялось 0.3–0.5 пА)

[36] на пике кальциевой вспышки. В другой работе оценка данной величины была немного меньше (8 пА) [35].

Таким образом, расчет потоков Ca^{2+} позволяет охарактеризовать роль различных буферных систем и систем выведения кальция из клетки, участвующих в формировании кальциевого сигнала при высвобождении этих ионов из депо; что немаловажно, можно оценить и динамику указанных процессов. С использованием такого подхода можно определить, когда началось или прекратилось высвобождение кальция из депо. Это невозможно сделать на основании определения лишь изменений абсолютных значений концентрации свободного кальция [34].

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В НЕЙРОНАХ

Для большинства нейронов, находящихся в состоянии покоя, характерна весьма низкая внутриклеточная концентрация свободного кальция (50–100 нМ), но этот показатель может повышаться до 10 мкМ при интенсивной электрической активности клетки [3]. Так, уровень кальция в дендритах поднимался до 5 мкМ во время развития синаптически вызванных кальциевых волн [37, 38]. Учитывая столь большой диапазон изменений $[\text{Ca}^{2+}]$, определение точных величин кальциевых потоков является сложной, но обязательной задачей при исследовании специфических механизмов кальциевой сигнализации в нейронах. Информация о пространственном распределении соответствующих каналов и рецепторов весьма ограничена, однако ясно, что молекулярные механизмы и картины высвобождения Ca^{2+} в разных областях клетки и в нейронах разных типов существенно различаются [39].

Кальциевые сигналы, обусловленные выходом этого элемента из внутриклеточных депо, были обнаружены в нейронах при разных физиологических стимулах [40–42]. Хорошо известно, что высвобождение Ca^{2+} из ЭР происходит в условиях открывания каналов IP_3R и RyR [43]. IP_3 -опосредованное высвобождение кальция в дендритах чаще всего инициируется действием нейромедиаторов (например, глутамата) [44], а RyRs могут активироваться повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Вход ионов кальция через VGCC активирует RyR по-

средством кальцийопосредованного процесса, который ныне получил общепотребляемое название «кальцийиндуцированное высвобождение кальция» (CICR). Этот процесс может способствовать значительному усилению притока кальция, вызванного генерацией одного или нескольких потенциалов действия в соме нейронов [45, 46]. Деятельность внутриклеточных рецепторов обоих типов (IP_3R и RyR) регулируется различными внутриклеточными факторами, в том числе уровнем самого кальция [47]. Его ионы могут оказывать действие на упомянутые каналы как с люменальной, так и с цитозольной стороны мембраны. Такая кальциевая регуляция фактически обеспечивает функционирование петли обратной связи, координирующее приток Ca^{2+} из внутриклеточного депо в цитозоль; в случае IP_3 подобный механизм может играть важную роль в генерации дендритных кальциевых волн. Последние вызываются активацией синапсов в пирамидных нейронах коры и гиппокампа и клетках некоторых других типов [37, 48]. В пресинаптических терминалях вход Ca^{2+} запускает процесс экзоцитоза синаптических везикул, содержащих в себе молекулы нейротрансмиттера [49, 50]. В свою очередь, транзистентные увеличения уровня кальция вблизи постсинаптической мембраны дендритов модулируют развитие синаптической пластичности [51].

Локальные кальциевые события, такие как кальциевые вспышки и паффы, в соме нейронов долгое время не обнаруживались; считалось, что они в теле клеток отсутствуют или крайне редки. Это заключение, вероятно, было обусловлено отсутствием кластеризации RyR и IP_3R в нервных клетках (в отличие от волокон скелетных мышц и кардиомиоцитов), низкими уровнями соответствующих сигналов и относительно высоким уровнем шума. Однако впоследствии такие события были успешно выявлены в клетках PC12, претерпевших дифференциацию под действием нейрального фактора роста [52], а также в дендритах пирамидных нейронов в срезах гиппокампа [42]. В мембране дендритных шипиков RyR распределены относительно равномерно. Резкое увеличение концентрации кальция в результате его входа через каналы NMDA-рецепторов и VDCC вызывает высвобождение кальция из ЭР [4]. В этом случае кальциевые события опосредованы в основном активностью RyR , но активность IP_3R также была задействована.

«Быстрая» флуоресцентная микроскопия позво-

ляет выполнять анализ кальциевой сигнализации в возбудимых клетках. В этом аспекте актуальным является исследование быстрых локальных кальциевых событий – как всплесков, так и паффов. Данные феномены к настоящему времени были обнаружены во множестве возбудимых клетках.

Для исследования кальциевой сигнализации в нейронах важным является дифференцированное выявление вклада $RyRs$ или IP_3R при высвобождении кальция из внутриклеточного депо. Паттерны и функциональная роль пространственного распределения локальных кальциевых событий (как всплесков, так и паффов) в дендритах нейронов до настоящего времени не выяснены. Изучение IP_3R -опосредованных локальных событий усложнено необходимостью инициирования синаптической активности для их выявления, что приводит к активации самих этих клеточных рецепторов. Таким образом, исследования указанных кальциевых событий пока значительно затруднены не только чисто технически, но и структурно-функциональным базисом проявления данных событий.

Появление новых флуоресцентных красителей, обладающих высокой чувствительностью, и новых детекторов с низкими уровнями шумов (что позволяет детектировать даже отдельные фотоны), очевидно, позволит регистрировать крайне малые кальциевые события, и это даст возможность более адекватно представить роли и RyR , и IP_3R в кальциевой сигнализации в нейронах и других возбудимых клетках.

•••••

Таким образом, в исследованиях изменений $[Ca^{2+}]_i$ в целом, распределения кальция в пределах клетки и потоков, обуславливающих перераспределение данных ионов, существует множество различных подходов, ряд которых были описаны выше. Каждый из рассмотренных методов имеет свои достоинства, ограничения и недостатки. Понятно, что для обеспечения корректных результатов исследования кальциевой сигнализации в клетке целесообразно использовать несколько различных подходов.

Выяснение механизмов внутриклеточной кальциевой сигнализации имеет колоссальное значение для понимания клеточных и молекулярных механизмов функционирования нейронов и других возбудимых клеток. Ионы кальция выполняют

уникальную роль основного "действующего лица" системы внутриклеточной сигнализации. Детальная адекватная интерпретация таких процессов позволяет идентифицировать возможные дефекты такой сигнализации, являющиеся важными или основными патогенетическими факторами при различных патологиях клетки или целого организма.

Данный обзор не был связан с какими-либо исследованиями на людях или животных, и подтверждения существующим этическим нормам не требовалось.

Автор данного обзора – В. М. Шкрыль – подтверждает отсутствие конфликтов любого рода, касающихся коммерческих или финансовых отношений и отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием.

В. М. Шкрыль¹

ВНУТРИШНЬОКЛІТИННІ КАЛЬЦІЄВІ ПОТОКИ В ЗБУДЛИВИХ КЛІТИНАХ

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Одним із важливих завдань сучасної клітинної біології є визначення не лише концентрацій різних внутрішньоклітинних іонів, зокрема кальцію, але і динаміки змін цих параметрів. Визначення концентрацій кальцію всередині клітини або навіть її окремих органел є можливим із використанням декількох експериментальних підходів – електронної мікроскопії, електрофізіологічних методик, флуоресцентно-оптичних методів і низки інших. Кальцій у клітині знаходиться у вільному (іонізованому) і зв'язаному стані. Локальні швидкі зміни рівня Ca^{2+} в певних локусах є індивідуальними квантами інтегрального осциляторного кальцієвого сигналу, що визначає багато функцій клітини. Розподіл кальцієвих потоків у різних клітинних компартментах і зв'язування ролі тих або інших кальцієвих рецепторів і каналів у плазматичній мембрані та мембранах внутрішньоклітинних органел дозволяє наблизитися до визначення внеску відповідних подій у регуляцію фізіологічних функцій клітини, наприклад синаптичної пластичності нейрона. В даному огляді описані методичні підходи для визначення концентрації кальцію та величини його потоків, що дозволяє охарактеризувати окремі компоненти кальцієвої сигналізації та виявити їх роль у регуляції різних функцій збудливих клітин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. J. Berridge, "Neuronal calcium signaling," *Neuron*, **21**, 13-26 (1998).
2. T. Pozzan, R. Rizzuto, P. Volpe, and J. Meldolesi, "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores," *Physiol. Rev.*, **74**, 595-636 (1994).
3. M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, "The versatility and universality of calcium signalling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 11-21 (2000).
4. D. Futagi and K. Kitano, "Ryanodine-receptor-driven intracellular calcium dynamics underlying spatial association of synaptic plasticity," *J. Comput. Neurosci.*, **39**, 329-347 (2015).
5. A. V. Somlyo, H. Shuman, and A. P. Somlyo, "Composition of sarcoplasmic reticulum in situ by electron probe X-ray microanalysis," *Nature*, **268**, 556-558 (1977).
6. T. A. Hall and B. L. Gupta, "The localization and assay of chemical elements by microprobe methods," *Quart. Rev. Biophys.*, **16**, 279-339 (1983).
7. S. B. Andrews, R. A. Buchanan, and R. D. Leapman, "Quantitative dark-field mass analysis of ultrathin cryosections in the field-emission scanning transmission electron microscope," *Scann. Microscop.*, Suppl., **8**, 13-23 (1994).
8. R. A. Buchanan, R. D. Leapman, M. F. O'Connell, et al., "Quantitative scanning transmission electron microscopy of ultrathin cryosections: subcellular organelles in rapidly frozen liver and cerebellar cortex," *J. Struct. Biol.*, **110**, 244-255 (1993).
9. R. D. Leapman and S. B. Andrews, "Analysis of directly frozen macromolecules and tissues in the field-emission STEM," *J. Microscop.*, **161**, 3-19 (1991).
10. L. D. Pozzo-Miller, N. B. Pivovarova, J. A. Connor, et al., "Correlated measurements of free and total intracellular calcium concentration in central nervous system neurons," *J. Microscop. Res. Tech.*, **46**, 370-379 (1999).
11. E. Neher, "The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes," *Neuropharmacology*, **34**, 1423-1442 (1995).
12. R. D. Leapman, S. Q. Sun, J. A. Hunt, and S. B. Andrews, "Biological electron energy loss spectroscopy in the field-emission scanning transmission electron microscope," *Scann. Microscop.*, Suppl., **8**, 245-258 (1994).
13. H. Shuman and A. P. Somlyo, "Electron energy loss analysis of near-trace-element concentrations of calcium," *Ultramicroscopy*, **21**, 23-32 (1987).
14. A. B. Borle, "An overview of techniques for the measurement of calcium distribution, calcium fluxes, and cytosolic free calcium in mammalian cells," *Environ. Health. Perspect.*, **84**, 45-56 (1990).
15. T. Uchikawa and A. B. Borle, "Studies of calcium-45 desaturation from kidney slices in flow-through chambers," *Am. J. Physiol.*, **234**, R34-R38 (1978).
16. A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter, and B. Herman, "Measurement of intracellular calcium," *Physiol. Rev.*, **79**, 1089-1125 (1999).
17. S. Baudet, L. Hove-Madsen, and D. M. Bers, "How to make and use calcium-specific mini- and microelectrodes," *Methods Cell Biol.*, **40**, 93-113 (1994).
18. S. Q. Wang, L. S. Song, E. G. Lakatta, and H. Cheng, "Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells," *Nature*, **410**, 592-596 (2001).
19. B. L. Sabatini and W. G. Regehr, "Optical measurement of presynaptic calcium currents," *Biophys. J.*, **74**, 1549-1563 (1998).
20. S. M. Baylor, W. K. Chandler, and M. W. Marshall, "Calcium release and sarcoplasmic reticulum membrane potential in frog skeletal muscle fibres," *J. Physiol.*, **348**, 209-238 (1984).
21. G. Brum, E. Rios, and E. Stefani, "Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres," *J. Physiol.*, **398**, 441-473 (1988).
22. O. Delbono and G. Meissner, "Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rat slow- and fast-twitch muscles," *J. Membrane Biol.*, **151**, 123-130 (1996).
23. J. Garcia and M. F. Schneider, "Calcium transients and calcium release in rat fast-twitch skeletal muscle fibres," *J. Physiol.*, **463**, 709-728 (1993).
24. W. Melzer, E. Rios, and M. F. Schneider, "A general procedure for determining the rate of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers," *Biophys. J.*, **51**, 849-863 (1987).
25. N. Shirokova, J. Garcia, G. Pizarro, and E. Rios, "Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle," *J. Gen. Physiol.*, **107**, 1-18 (1996).
26. S. M. Baylor, W. K. Chandler, and M. W. Marshall, "Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from Arsenazo III calcium transients," *J. Physiol.*, **344**, 625-666 (1983).
27. W. Melzer, E. Rios, and M. F. Schneider, "Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibers," *Biophys. J.*, **45**, 637-641 (1984).
28. E. Rios, M. D. Stern, A. Gonzalez, et al., "Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle," *J. Gen. Physiol.*, **114**, 31-48 (1999).
29. L. Figueroa, V. M. Shkryl, J. Zhou, et al., "Synthetic localized calcium transients directly probe signalling mechanisms in skeletal muscle," *J. Physiol.*, **590**, 1389-1411 (2012).
30. H. Cheng, W. J. Lederer, and M. B. Cannell, "Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle," *Science*, **262**, 740-744 (1993).
31. A. Tsugorka, E. Rios, and L. A. Blatter, "Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells," *Science*, **269**, 1723-1726 (1995).
32. I. Parker and I. Ivorra, "Localized all-or-none calcium liberation by inositol trisphosphate," *Science*, **250**, 977-979 (1990).
33. D. J. Santiago, J. W. Curran, D. M. Bers, et al., "Ca sparks do not explain all ryanodine receptor-mediated SR Ca leak in mouse ventricular myocytes," *Biophys. J.*, **98**, 2111-2120 (2010).
34. V. M. Shkryl, L. A. Blatter, and E. Rios, "Properties of Ca²⁺ sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle," *J. Gen. Physiol.*, **139**, 189-207 (2012).
35. C. H. Kong, D. R. Laver, and M. B. Cannell, "Extraction of sub-microscopic Ca fluxes from blurred and noisy fluorescent indicator images with a detailed model fitting approach," *PLoS Comput. Biol.*, **9**, e1002931 (2013).
36. C. Kettlun, A. Gonzalez, E. Rios, and M. Fill, "Unitary Ca²⁺ current through mammalian cardiac and amphibian skeletal muscle ryanodine receptor Channels under near-physiological ionic conditions," *J. Gen. Physiol.*, **122**, 407-417 (2003).

37. M. E. Larkum, S. Watanabe, T. Nakamura, et al., "Synaptically activated Ca^{2+} waves in layer 2/3 and layer 5 rat neocortical pyramidal neurons," *J. Physiol.*, **549**, 471-488 (2003).
38. L. D. Pozzo Miller, J. J. Petrozzino, G. Golarai, and J. A. Connor, " Ca^{2+} release from intracellular stores induced by afferent stimulation of CA3 pyramidal neurons in hippocampal slices," *J. Neurophysiol.*, **76**, 554-562 (1996).
39. A. Verkhratsky, "Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons," *Physiol. Rev.*, **85**, 201-279 (2005).
40. I. Llano, J. Gonzalez, C. Caputo, et al., "Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients," *Nat. Neurosci.*, **3**, 1256-1265 (2000).
41. C. Lohmann, A. Finski, and T. Bonhoeffer, "Local calcium transients regulate the spontaneous motility of dendritic filopodia," *Nat. Neurosci.*, **8**, 305-312 (2005).
42. S. Manita and W. N. Ross, "Synaptic activation and membrane potential changes modulate the frequency of spontaneous elementary Ca^{2+} release events in the dendrites of pyramidal neurons," *J. Neurosci.*, **29**, 7833-7845 (2009).
43. R. Rizzuto and T. Pozzan, "Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences," *Physiol. Rev.*, **86**, 369-408 (2006).
44. C. M. Niswender and P. J. Conn, "Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**, 295-322 (2010).
45. M. Kano, O. Garaschuk, A. Verkhratsky, and A. Konnerth, "Ryanodine receptor-mediated intracellular calcium release in rat cerebellar Purkinje neurones," *J. Physiol.*, **487**, 1-16 (1995).
46. R. W. Tsien and R. Y. Tsien, "Calcium channels, stores, and oscillations," *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 715-760 (1990).
47. M. J. Berridge, "Inositol trisphosphate and calcium signalling," *Nature*, **361**, 315-325 (1993).
48. T. Nakamura, J. G. Barbara, K. Nakamura, and W. N. Ross, "Synergistic release of Ca^{2+} from IP3-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials," *Neuron*, **24**, 727-737 (1999).
49. E. Neher and T. Sakaba, "Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release," *Neuron*, **59**, 861-872 (2008).
50. C. Grienerberger and A. Konnerth, "Imaging calcium in neurons," *Neuron*, **73**, 862-885 (2012).
51. R. S. Zucker, "Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity," *Current Opin. Neurobiol.*, **9**, 305-313 (1999).
52. S. Koizumi, M. D. Bootman, L. K. Bobanovic, et al., "Characterization of elementary Ca^{2+} release signals in NGF-differentiated PC12 cells and hippocampal neurons," *Neuron*, **22**, 125-137 (1999).