

Die bepaling van intrasellulêre vry kalsium in die neutrofiel met die fluoressente kalsiumindikators, fura-2 en fura-PE3

A.M. Koorts*, M. Viljoen en M.C. Kruger

Departement Fisiologie, Fakulteit Geneeskunde, Universiteit van Pretoria, Posbus 2034, Pretoria, 0001

E-posadres: akoorts@medic.up.ac.za

Ontvang 28 Augustus 2000; aanvaar 13 Oktober 2000

UITTREKSEL

Verskeie fluoressente kalsiumindikators is beskikbaar vir die bepaling van die konsentrasie van intrasellulêre vry kalsium. Die bekendste hiervan is fura-2. Die gebruik van onder andere fura-2 vir die bepaling van intrasellulêre vry kalsium kan verskeie probleme inhou. Een hiervan is die bepaling van verhoogde intrasellulêre vry kalsium a.g.v. die uitlek van die indikator na die ekstrasellulêre medium. Fura-PE3, 'n fluoressente kalsiumindikator verwant aan fura-2, is vervolgens gesintetiseer. Daar word voorgehou dat fura-PE3 nie noemenswaardig uitlek na die ekstrasellulêre medium nie. In die studie word aangetoon dat beide fura-2 en fura-PE3 teen ongeveer dieselfde tempo uitlek na die ekstrasellulêre medium in die neutrofiel en dat die bepaling van intrasellulêre vry kalsium met fura-PE3 dus geen werklike voordele bo fura-2 inhou nie. Daar word vervolgens aangetoon dat die herhaalbaarheid van die bepaling van intrasellulêre vry kalsium deur die fluoressente kalsiumindikators aanvaarbaar is indien die tydsverloop tussen die laai en wasstappe en die begin van die fluoressensiebepalings kort gehou word deur slegs een monster op 'n slag te doen, en dat die metode sensitiief genoeg blyk te wees om variasie in basale intrasellulêre vry kalsium waar te neem.

ABSTRACT

Intracellular free calcium determination in neutrophils with the fluorescent calcium indicators, fura-2 and fura-PE3
A large number of fluorescent calcium indicators are available for the determination of intracellular free calcium concentrations. The best known of these is fura-2. However, the employment of fura-2, amongst others, for the determination of intracellular free calcium is not problem-free. One of the problems encountered is the determination of an elevated intracellular free calcium concentration due to the leakage of the indicator to the extracellular medium. Fura-PE3, a fluorescent calcium indicator related to fura-2, was synthesised to overcome this problem. It is claimed that fura-PE3 shows no significant leakage to the extracellular medium. This study indicates that since both fura-2 and fura-PE3 leak from the neutrophil to the extracellular medium at more or less the same rate, the determination of neutrophil intracellular free calcium with fura-PE3 is not superior to that with fura-2. Subsequently it is indicated that the reproducibility of intracellular calcium determination with the fluorescent calcium indicators is acceptable as long as the time delay between the loading and the washing of the neutrophils and the start of the fluorescence determination is kept to a minimum by determining only one sample at a time. Furthermore, it appears that the method is sensitive enough to be able to indicate a change in basal intracellular free calcium.

INLEIDING

Die bepaling van intrasellulêre vry kalsium met die fluoressente kalsiumindikators het gelei tot 'n magdom ondersoeke na kalsium se rol in verskeie fisiologiese en patologiese prosesse. Die ontwikkeling van die fluoressente kalsiumindikators vir die bepaling van intrasellulêre vry kalsium het grootliks hier toe bygedra. Die fluoressente kalsiumindikators kan onder ander as esterderivate oor die selmembraan beweeg en dus is ekstreme procedures nie nodig om die indikator binne die sel te kry nie. Wanneer die esterkalsiumindikatorderivaat in die sitoplasma beland, sal esterases teenwoordig in die sitoplasma die esterverbindings breek.¹ Gevolglik word die penta-anionindikator gevorm wat die beskikbare vrykalsium-ione in die sitoplasma kan bind. Die verhouding van die fluoressensie van die kalsiumindikator gebonde aan kalsium tot die verhouding van die fluoressensie van die vrykalsiumindikator verteenwoordig die konsentrasie van die intrasellulêre vry kalsium.² Verskeie fluoressente kalsiumindikators is beskikbaar.² Die bekendste hiervan is fura-2. Alhoewel die bepaling van intrasellulêre vry kalsium met behulp van fura-

2 aanvaarbare resultate in verskeie seltipes oplewer, is daar aanduidings dat die uitlek van die indikator na die ekstrasellulêre medium en kompartementalisering in intrasellulêre organelle aanleiding mag gee tot afwykings in die waardes vir die konsentrasie van intrasellulêre vry kalsium.³ 'n Verbeterde fluoressente kalsiumindikator is onlangs beskikbaar gestel om hierdie probleme te omseil. Hierdie kalsiumindikator, fura-PE3, verwant aan fura-2, was gesintetiseer om uitlek na die ekstrasellulêre medium en kompartementalisering in intrasellulêre organelle van die indikator te voorkom.³ Die bepaling van intrasellulêre vry kalsium in die neutrofiel is tot onlangs slegs m.b.v. fura-2 bepaal.^{4,5,6} Daar is tans geen gepubliseerde resultate van die bepaling van intrasellulêre vry kalsium in die neutrofiel met behulp van fura-PE3 beskikbaar nie. Hierdie studie stel ondersoek in na die gebruik van fura-PE3 in die bepaling van intrasellulêre vry kalsium in neutrofiele en die vergelyking hiervan met die gebruik van fura-2. Beide hierdie fluoressente kalsiumindikators is geskik vir die bepaling van intrasellulêre vry kalsium met 'n Kd vir fura-2 van 224 nM en 'n Kd vir fura-PE3 van 250 nM.³

* Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.

MATERIALE EN METODES

Vir die bepaling van intrasellulêre vry kalsium is dit nodig om neutrofiele te isoler sonder om enige funksionele skade wat mag lei tot 'n verandering in intrasellulêre vry kalsium te veroorsaak.

Isolering van neutrofiele

Polimorfonukleêre leukosiete is soos volg vanuit 7 ml volbloed met "suur-sitraat-dekstrose" (ACD) (Becton Dickenson Vacutainer sisteme) as antikoagulant geïsoleer. Ses ml ACD-volbloed is bo-op 'n volume van 3 ml ficoll-hypaque (Histopaque - 1077 Sigma Kat. No. 1077-1) in 'n koniese buis (15 ml) gepipeteer en daarna teen 800 Xg by 12 °C vir 25 minute gesentrifugeer. Die polimorfonukleêre leukosiete (PMNL's) vorm 'n wit laag bo-op die massa rooibloedselle in die onderpunt van die buis. Die supernatant is verwys en die rooibloedselle met 'n ammoniumchloriedoplossing geliseer (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0.25 mM EDTA). Die PMNL's is hierna een maal met 4 ml Hepes-gebufferde Hanks-oplossing gewas (Highveld Biological PTY.LTD. Kat. No. CN 2027-3, KCl, KH₂PO₄, Glukose, MgSO₄.7H₂O, Hepes, NaHCO₃, CaCl₂, pH 7.4 25 °C) en finaal in 2 ml van die buffer gesuspender. Hierdie is 'n aanpassing van die metode van Böyum.⁷

Bepaling van intrasellulêre vry kalsium ($[Ca^{2+}]_i$) in die neutrofiel

Bepaling van $[Ca^{2+}]_i$ in die neutrofiel is soos volg met beide die fluoresente kalsiumindikators, fura-2 (fura-2/AM Sigma Kat. No. F 0888) en fura-PE3 (fura-PE3/AM Sigma Kat. No. F 0918) uitgevoer. Die geïsoleerde PMNL's is in 'n 0.25%-BSA/Hanks-buffer by 'n konsentrasie van 2×10^6 selle/ml geherspender en met óf fura-2/AM (finale konsentrasie 2 μ M) óf fura-PE3/AM (finale konsentrasie 2 μ M) vir 30 minute by 37 °C in 'n bewegende waterbad en vir 'n addisionele 30 minute by kamertemperatuur gelaai. Die neutrofielsuspensie met die kalsiumindikators is gedurende hierdie laaiperiode teen lig beskerm. Hierna is die neutrofielsuspensie teen 350 Xg by 12 °C vir 10 minute gesentrifugeer en die supernatant verwys om van die oortollige indikator ontslae te raak. Die neutrofiele is daarna twee maal met 'n 0.25%-BSA/Hanks-buffer gewas en finaal by 'n konsentrasie van 2×10^6 selle/ml geherspender. 900 μ l van hierdie oplossing is in die spektrofluorometerkuvet (Perkin Elmer LS 50B spektrofotometer) geplaas by 37 °C, en nog 1100 μ l van die 0.25%-BSA/Hanks-buffer bygevoeg. Nadat die vlakte van basaal intrasellulêre vry kalsium bepaal is, is formiel-metiel-leusiel-fenielalanien (fMLP Sigma Kat. No. F 3506) met finale konsentrasie van 1 μ M bygevoeg om 'n kalsium respons uit te lok. Vir die kalibrering aan die einde van die eksperiment is 100 μ l van 'n TritonX-100-oplossing (1% v/v) bygevoeg om die selle te liseer. Bepaling van fluoresensie by 'n maksimum kalsium-konsentrasie het gevolg. Ten einde die fluoresensie vir minimum kalsium-konsentrasie te bepaal, is 100 μ l van 'n 0.5 M EGTA/3 M Tris pH 8.7 by 25 °C bygevoeg. Om die konsentrasie van intrasellulêre vry kalsium te bereken, is die Grynkiewicz-vergelyking opgelos.⁸

Bepaling van die uitlek van die indikators na die ekstrasellulêre medium

Dic opeenvolgende stappe vir die bepaling van die uitlek van die indikators sluit in a) isolering van die neutrofiele; b) laai van die indikators óf fura-2 óf fura-PE3; c) was van die neutrofielsuspensie om van die oortollige indikators in die medium ontslae te raak (al die stappe tot dusver is beskryf in die vorige paragraaf); d) inkubasic van die neutrofielsuspensie; e)

bepaling van die fluoressensiewaardes; f) byvoeging van die nikkelchloriedoplossing; g) bepaling van die fluoressensiewaardes. Die inkubasietye en -temperature vir stap d was soos volg – twee minute op ys vir 'n alikwot van die neutrofielsuspensie en vir 'n tweede alikwot van dieselfde neutrofielsuspensie 50 minute op ys. Met die einde van die onderskeie inkubasieperiodes is die basaalvlak-fluoressensie bepaal, waarna 20 μ l van 'n nikkelchloriedoplossing (finale nikkelchloried-konsentrasie 2 mM – Sigma Kat. No. N 6136) bygevoeg is. Nikkel is gebruik om die fluoressensie van die kalsiumindikators wat teenwoordig is in die ekstrasellulêre medium te blus.² Die afname in die verhouding tussen fluoressensie by 340 nm en die fluoressensie by 380 nm was 'n aanduiding van die uitlek van die indikators na die ekstrasellulêre medium, wat plaasgevind het gedurende die inkubasieperiode. Hierdie prosedure is vir beide die indikators, fura-2 en fura-PE3 uitgevoer. Vervolgens is die verhoging in die konsentrasie van intrasellulêre vry kalsium bepaal met die uitlek van die kalsiumindikators.

Bepaling van die verhoging in die konsentrasie van intrasellulêre vry kalsium a.g.v. die uitlek van die indikators na die ekstrasellulêre medium

Met die byvoeging van nikkelchloried is dit nie moontlik om die kalibreringstappe aan die einde van die eksperimentele procedures uit te voer nie. Om die konsentrasie van intrasellulêre vry kalsium te kan bepaal wat verkeerdelik gemeet word a.g.v. die uitlek van die indikators na die ekstrasellulêre medium is 'n parallelle stel eksperimente uitgevoer. Intrasellulêre vry kalsium is na 'n inkubasieperiode van twee minute vir 'n alikwot van die neutrofielsuspensie, en vir 'n tweede alikwot van dieselfde neutrofielsuspensie na 'n inkubasieperiode van 50 minute bepaal.

Ondersoek na die herhaalbaarheid en sensitiwiteit van die bepaling van intrasellulêre vry kalsium in die neutrofiel

Om die herhaalbaarheid van die bepaling van intrasellulêre vry kalsium in die neutrofiel met behulp van die fluoresente kalsiumindikators te ondersoek, is die volgende uitgevoer: Eerstens is die intrasellulêre vry kalsium vir dieselfde persoon se neutrofiele op verskillende geleenthede bepaal. Tweedens is die intrasellulêre vry kalsium vir verskillende persone se neutrofiele op verskillende geleenthede bepaal. Om die sensitiwiteit van die metode vir die bepaling van intrasellulêre vry kalsium in die neutrofiel met behulp van die fluoresente kalsiumindikators te ondersoek, is bepalings in verskeie pasiënte gedoen.

RESULTATE

Figuur 1 en figuur 2 stel die afname voor in die waarde vir die verhouding tussen die fluoressensie vir die 340 nm-golflengte en die 380 nm-golflengte vir onderskeidelik fura-2 en fura-PE3 met die byvoeging van nikkelchloried na 'n inkubasieperiode van twee minute op ys. Figuur 3 en figuur 4 stel die afname voor in die waarde vir die verhouding tussen die fluoressensie vir die 340 nm-golflengte en die 380 nm-golflengte vir onderskeidelik fura-2 en fura-PE3 met die byvoeging van nikkelchloried na 'n inkubasieperiode van 50 minute op ys. Tabel 1 bevat 'n opsomming van hierdie waardes en die afname in hierdie waardes met die toediening van nikkelchloried. Vir fura-2 is 'n afname van 1.26 na 1.21 met nikkelchloried-toediening na die tweeminute-inkubasieperiode gevind, terwyl vir fura-PE3 'n afname van 1.19 na 1.17 met nikkelchloried-toediening vir dieselfde periode waargeneem is. Vir fura-2 is 'n afname van 1.36 na 1.26 met nikkelchloriedtoediening na die 50-minute-inkubasieperiode gevind, terwyl vir fura-PE3 'n

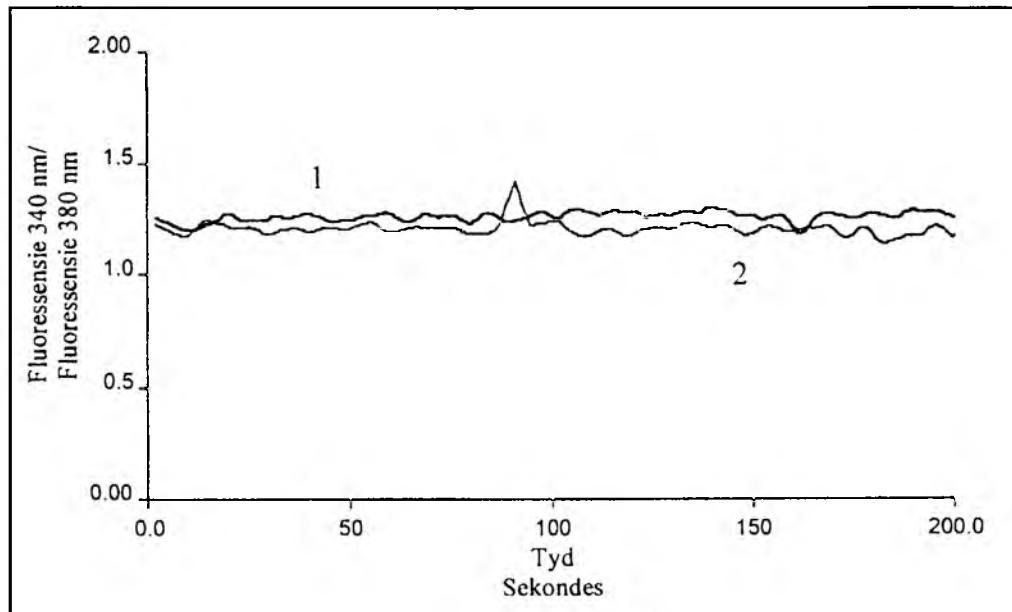
afname van 1.26 na 1.17 met nikkelchloriedtoediening vir dieselfde periode waargeneem is. Beide die indikators, fura-2 en fura-PE3 het dus na die ekstrasellulêre medium gelek. Fura-PE3 se uitlekking was egter van kleiner omvang, veral met die tweeminute-inkubasieperiode. Figuur 5 stel die skyn toename in intrasellulêre vry kalsium voor wat gemeet word a.g.v. die uitlek van die fluoressente kalsiumindikator na die ekstrasellulêre medium gedurende die 50-minute-inkubasieperiode. Die uitlek van die kalsiumindikators verteenwoordig 'n skynverhoging van 17 nM in die konsentrasie van die intrasellulêre vry kalsium oor 'n 50-minute-inkubasieperiode. Die skyntename in intrasellulêre vry kalsium soos bepaal vir fura-PE3 na 'n inkubasieperiode van twee minute verteenwoordig 2 nM, en is weglaatbaar klein.

Die hieropvolgende bepalings vir die herhaalbaarheid en sensitiwiteit van die tegnick is gedoen met die kalsiumindikator, fura-PE3 en vir 'n inkubasieperiode van twee minute. Figuur 6 stel die bepalings van intrasellulêre vry kalsium voor soos verkry vir dieselfde persoon se neutrofiele oor 'n tydperk van twee weke ($n = 4$). Die waardes vir basaal intrasellulêre vry kalsium was soos volg: 45 nM, 54 nM, 52 nM, 45 nM. Figuur 7 stel intrasellulêre vry kalsium voor soos verkry vir ses verskillende persone se neutrofiele oor 'n tydperk van drie weke. Om verlengde inkubasieperiodes te verhoed en sodoende uitlekking te minimaliseer, is slegs een bepaling per dag gedoen. Die waardes vir basale intrasellulêre vry kalsium was soos volg:

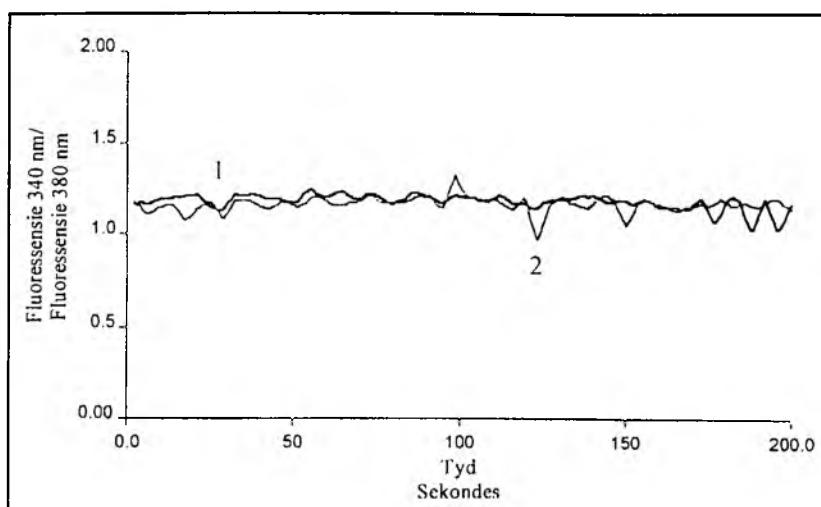
50 nM, 52 nM, 50 nM, 52 nM, 57 nM, 53 nM. Die volgende stap was om te bepaal of die metode wel sensitief genoeg is om variasies in intrasellulêre vry kalsium te meet. Figuur 8 tot 11 stel die bepalings van intrasellulêre vry kalsium voor vir verskeie intensiewesorgpasiënte. Vir elk van die pasiënte, behalwe vir een weens komplikasies, is twee bepalings uitgevoer en word dit op dieselfde grafiek voorgestel. Die twee bepalings per pasiënt is uitgevoer op stadia van die hospitalisering waarin daar duidelike aanduidings van óf verbetering óf agteruitgang in die pasiënt se toestand waarneembaar was. .

Tabel 1 Die fluoressensieverhoudingwaardes voor en na nikkelchloriedbyvoeging vir beide fura-2 en fura-PE3 soos bepaal na die 2-minute- en na die 50-minute-inkubasieperiodes

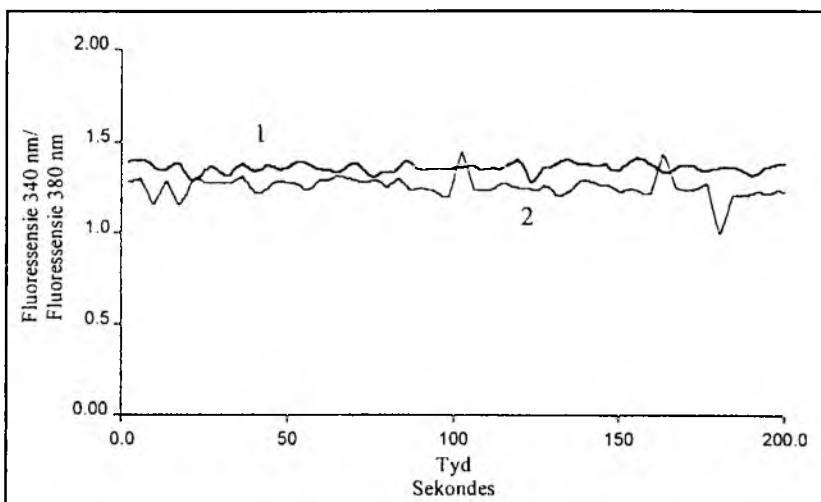
Inkubasie tye	Voor nikkel-chloried-toediening	Na nikkel-chloried-toediening	Verskil
Fura-2: 2 minute	1,26	1,21	0,05
Fura-PE3: 2 minute	1,19	1,17	0,02
Fura-2: 50 minute	1,36	1,26	0,1
Fura-PE3: 50 minute	1,26	1,17	0,09



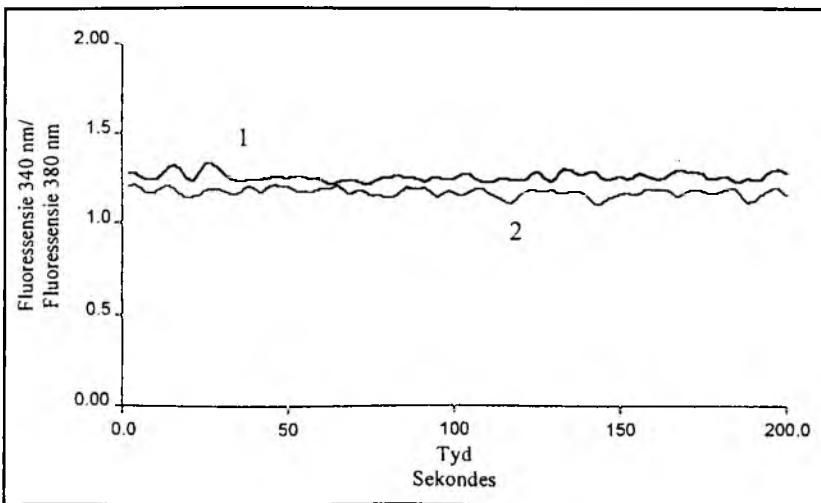
Figuur 1: Twee verhoudings fluoressensiegrafiese van fura-2 na 'n tweeminute-inkubasieperiode. Die eerste is bepaal voor die byvoeging van nikkelchloried en die tweede is bepaal na die byvoeging van nikkelchloried. Die grafiese toon 'n verlaging in die fluoressensieverhoudingwaardes van 1.26 na 1.21 aan.



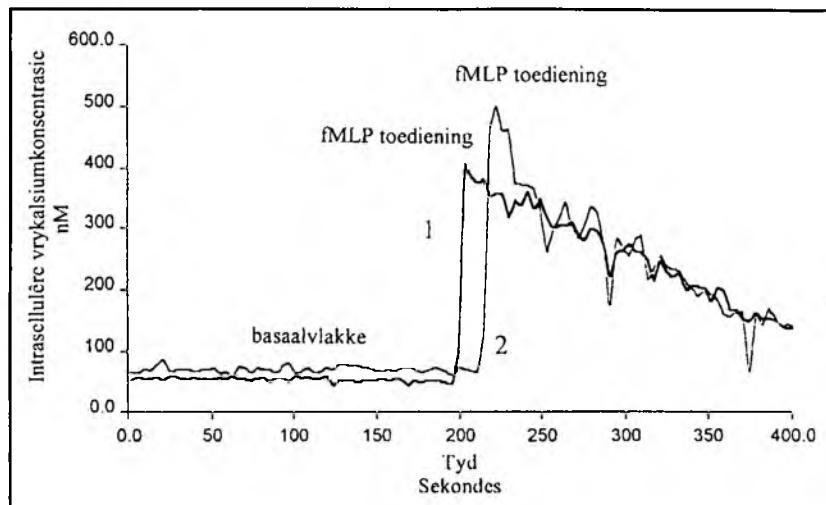
Figuur 2: Twee verhoudings fluoressensiegrafiese van fura-PE3 na 'n tweeminute-inkubasieperiode. Die eerste is bepaal voor die byvoeging van nikkelchloried en die tweede is bepaal na die byvoeging van nikkelchloried. Die grafiese toon 'n verlaging in die fluoressensieverhoudingwaardes van 1.19 na 1.17 aan.



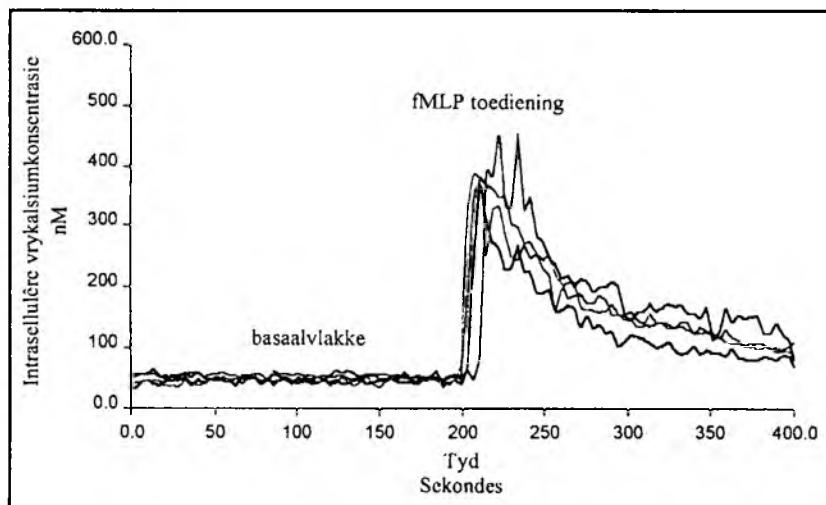
Figuur 3: Twee verhoudings fluoressensiegrafiese van fura-2 na 'n 50-minute-inkubasieperiode. Die eerste is bepaal voor die byvoeging van nikkelchloried en die tweede is bepaal na die byvoeging van nikkelchloried. Die grafiese toon 'n verlaging in die fluoressensieverhoudingwaardes van 1.36 na 1.26 aan.



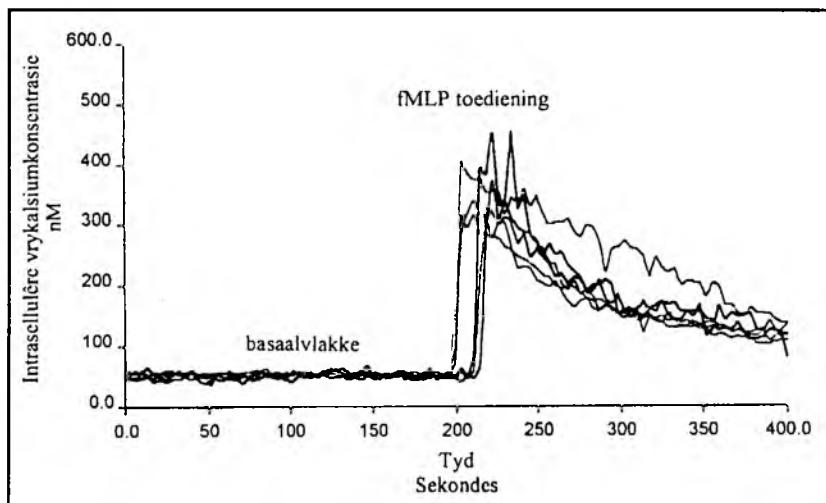
Figuur 4: Twee verhoudings fluoressensiegrafiese van fura-PE3 na 'n 50-minute-inkubasieperiode. Die eerste is bepaal voor die byvoeging van nikkelchloried en die tweede is bepaal na die byvoeging van nikkelchloried. Die grafiese toon 'n verlaging in die fluoressensieverhoudingwaardes van 1.26 na 1.17 aan.



Figuur 5: Twee intraselluläre vrykalsiumkonsentrasiegrafiese. Die eerste grafiek verteenwoordig die intraselluläre vrykalsiumkonsentrasie soos bepaal voor die begin van die 50-minute-inkubasieperiode en die tweede grafiek verteenwoordig die intraselluläre vrykalsiumkonsentrasie soos bepaal aan die einde van die 50-minute-inkubasieperiode. 'n Toename in intraselluläre vry kalsium van 17 nM word bepaal a.g.v. die uitlek van die indikator na die ekstraselluläre medium gedurende die 50-minute-inkubasieperiode.

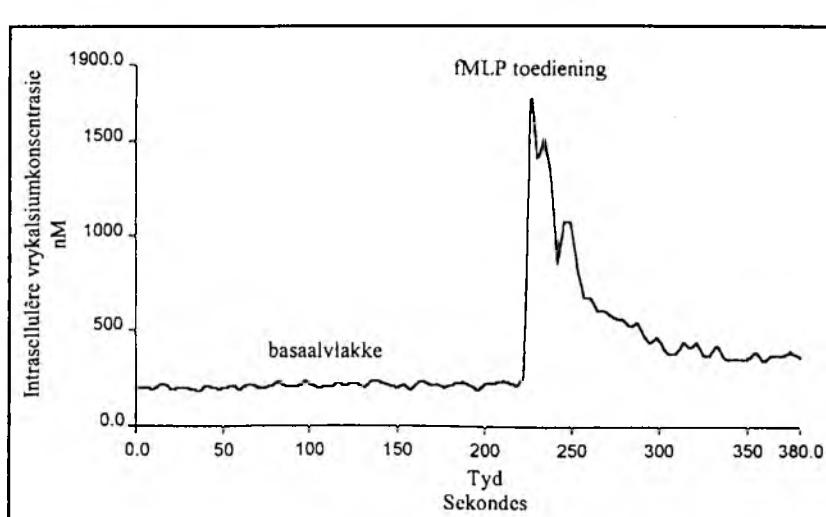
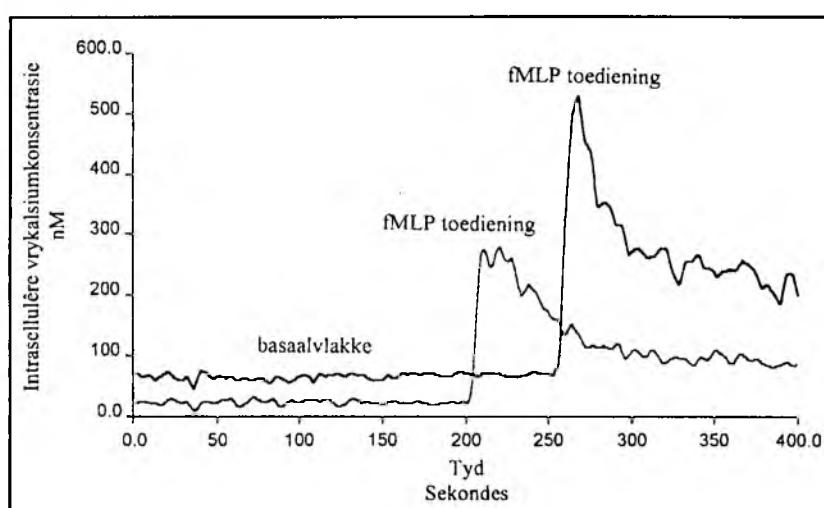
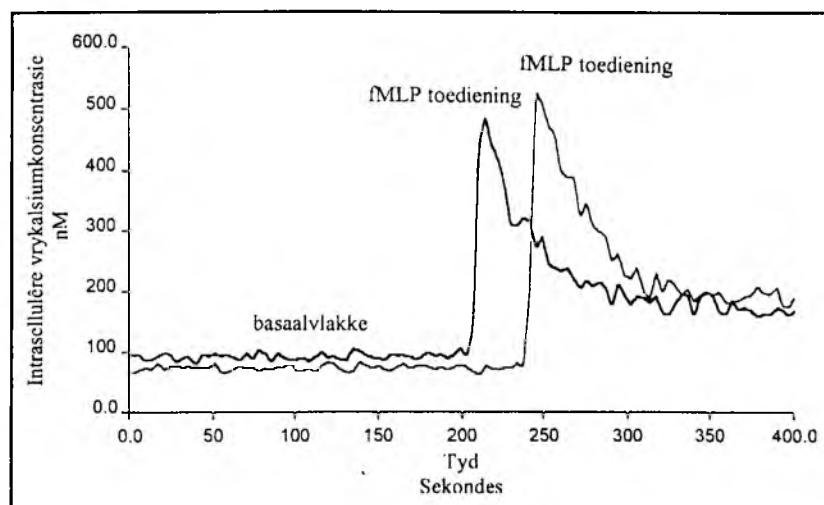


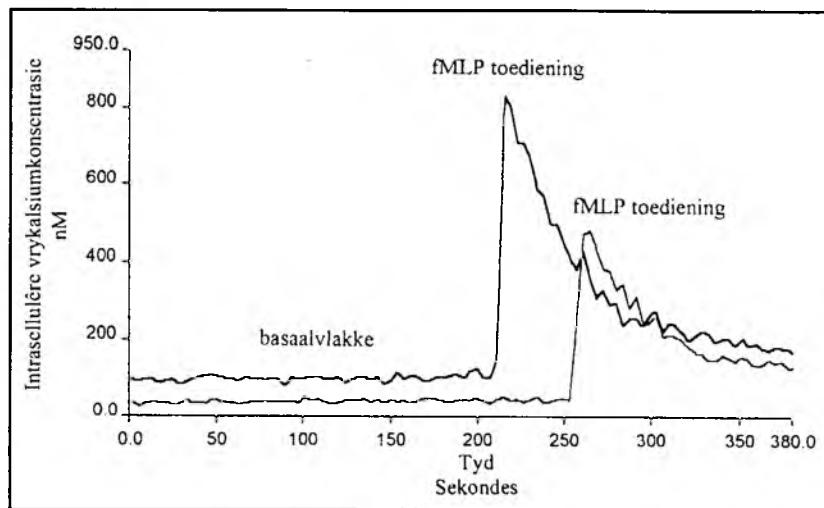
Figuur 6: Grafiese wat die intraselluläre vrykalsiumkonsentrasies verteenwoordig soos bepaal vir dieselfde persoon oor 'n tydperk van twee weke.



Figuur 7: Grafiese wat die intraselluläre vrykalsiumkonsentrasies verteenwoordig soos bepaal vir verskillende persone oor 'n tydperk van drie weke.

Figure 8 tot 11: Grafiese wat die intrasellulêre vrykalsiumkonsentrasies verteenwoordig soos bepaal vir vier pasiënte. Vir die pasiënte waarvoor intrasellulêre vrykalsiumbepalings twee keer uitgevoer is, word 'n verandering in intrasellulêre vry kalsium wat gepaardgaan met 'n verandering in die kliniese kondisie van die pasiënt aangetoon.





FIGUUR 11

BESPREKING

Dic uitlek van fluorescente kalsiumindikators na die ekstrasellulêre medium kan die bepaling van die konsentrasies van intrasellulêre vry kalsium in selle kompliseer. Dit is veral 'n probleem met die bepaling van die konsentrasies van intrasellulêre vry kalsium in 'n spektrofluorometerkuvet wanneer van media met 'n fisiologiese kalsiumkonsentrasie gebruik gemaak word.² In 'n spektrofluorometerkuvet word die fluorescensiebepalings verkry van alle indikatormolekules, hetby in die ekstrasellulêre medium of in die sitoplasma. Indien daar dus noemenswaardige uitlek van die kalsiumindikator na die ekstrasellulêre medium plaasgevind het, sal die indikators in die ekstrasellulêre medium lei tot die bepaling van 'n verhoogde konsentrasie van die intrasellulêre vry kalsium a.g.v. die fisiologiese kalsiumkonsentrasie in die ekstrasellulêre medium. Dit is bekend dat die fluorescente kalsiumindikator fura-2 mag uitlek na die ekstrasellulêre medium en dus aanleiding kan gee tot die meet van 'n verhoogde konsentrasie van die intrasellulêre vry kalsium. Fura-PE3, 'n indikator verwant aan fura-2, is ontwikkel in 'n poging om uitlekking te verminder en word ook as sulks deur die patenthouers voorgehou.³ Uit die resultate van hierdie studie is daar geen noemenswaardige verskil gevind tussen die mate van uitlek vir fura-2 en fura-PE3 nie - veral nie met 'n verlengde inkubasieperiode nie. In normale roetine-analises verteenwoordig die verlengde inkubasieperiode die tyd wat dit sou neem indien meer as een monster op 'n keer gedoen word. Die praktiese implikasies van die resultate is dat die bepalings nog steeds, so gou moontlik ná die laai en wasstappe gedoen moet word. Die bepaling van intrasellulêre vry kalsium van meer as een bloedmonster per keer word dus uitgeskakel. Fura-PE3 bied hier dus geen voordeel bo fura-2 nie, in teenstelling met dit wat deur die patenthouers voorgehou word. Dit is egter nodig om te benadruk dat die resultate slegs van toepassing is vir neutrofiele, siende dat verskillende seltipes varieer in hul vermoë om die kalsiumindikators te hanteer. Wat betref die gesiktheid van beide fura-2 en fura-PE3 vir die bepaling van intrasellulêre vry kalsium: beide die indikators lek na die ekstrasellulêre medium, maar indien die inkubasietye so kort as moontlik en konstant gehou word vir verskillende monsters is die tegniek aanvaarbaar. Die uitlek na die ekstrasellulêre medium sal natuurlik eksperimente met 'n lang tydsverloop kompliseer. Die waardes wat verkry is op normale gesonde persone wys dat die herhaalbaarheid goed is. Die vraag of die metode wel sensitief genoeg is om variasies aan te toon, het

vervolgens ontstaan. Bepaling van intrasellulêre vry kalsium in intensiewesorgpatiënte het getoon dat die metode wel variasies kan aandui. Alhoewel nie hier getoon nie omdat nog nie genoeg resultate verkry is nie, wil dit voorkom asof 'n drastiese verhoging in intrasellulêre vry kalsium sonder terugkeer na normaal gepaardgaan met 'n swak prognose.

Samevattend kan gesê word dat die bepaling van intrasellulêre vry kalsium in neutrofiele met fura-PE3 geen werklike voordele inhoud bo fura-2 nie, dat die herhaalbaarheid van die bepaling van intrasellulêre vry kalsium deur beide die fluorescente kalsiumindikators aanvaarbaar is indien die tydsverloop tussen die laai en wasstappe en die begin van die fluorescensiebepalings kort gehou word deur slegs een monster op 'n slag te doen, en dat die metode sensitief genoeg blyk te wees om variasie in intrasellulêre vry kalsium waar te neem.

Befondsing: NRF fonds, MC Kruger; Navkom 1999 AM Koorts

LITERATUURVERWYSINGS

- Rink, T.J. (1988). Measurement of Cytosolic Calcium: Fluorescent Calcium Indicators, *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 14, 7-14.
- Thomas, A.P., Delaville, F. (1991). The Use of Fluorescent Indicators for Measurement of Cytosolic-Free Calcium Concentration in Cell Populations and Single Cells. In *Cellular Calcium: A Practical Approach*, McCormack, J.G., Cobbold, P.H. eds. (Oxford University Press, New York) p. 1-54.
- Vordran, C., Minta, A., Poenie, M. (1995). New Fluorescent Calcium Indicators Designed for Cytosolic Retention or Measuring Calcium near Membranes, *Biophysical Journal*, 69, 2112-2124.
- Waddell, T.K., Fialkow, L., Chan C.K., Kishimoto, T.K., Downey, G.P. (1994). Potentiation of the Oxidative Burst of Human Neutrophils, *The Journal of Biological Chemistry*, 269(28), 18485-18491.
- Collison, K.S., Kwaasi, A.A.A., Parhar, R.S., Al-Sedairy, S.T., Al-Mohanna, F.A.A. (1995). Monomeric Human IgE Evokes a Transient Calcium Rise in Individual Human Neutrophils, *Journal of Leukocyte Biology*, 58, 459-467.
- Theler, J.M., Lew, D.P., Jaconi, M.E., Krause, K-H., Wollheim, C.B., Schlegel, W. (1995). Intracellular Pattern of Cytosolic Ca²⁺ Changes During Adhesion and Multiple Phagocytosis in Human Neutrophils. Dynamics of Intracellular Ca²⁺ Stores, *Blood*, 85(8), 2194-2201.
- Böyum, A. (1968). Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation - Supplement*, 97, 77-89.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440-3450.