LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

PATVIRTINTA
Kauno medicinos universiteto
Senato 2005 m. spalio 19 d.
Nutarimu Nr. 2-08

ATNAUJINTA
2026 lapkričio 4 d.

LĄSTELIŲ KULTŪRŲ IR AUDININIŲ BIOFIZIKINIAI TYRIMO METODAI

DOKTORANTŪROS STUDIJŲ DALYKO PROGRAMA

Dalyko programos koordinatorius:
Kardiologijos instituto Membranų biofizikos laboratorijos vedėja dr. R. Mačianskienė_____
padalinio pavadinimas,vadovo pareigos, pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė parašas

Padaliniai, dalyvaujantys dalyko programoje:
Kardiologijos instituto Membranų biofizikos laboratorija, vedėja dr. R. Mačianskienė_____
padalinio pavadinimas, vadovo pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė parašas

Kaunas, 2026

Dalyko programos duomenys

Mokslų sritis	Gamtos mokslai, Medicinos ir sveikatos mokslai
Mokslo kryptis (kodas)	Biofizika – N 011, medicina – M 001
Dalyko pavadinimas	Ląstelių kultūrų auginimas ir jų biofizikiniai tyrimo metodai
Programos apimtis	160 val. (6 ECTS)
Paskaitos	40 val.
Seminarai	40 val.
Savarankiškas darbas	80 val.

Dalyko programos rengimo grupė

Eil. Nr.	Pedagoginis vardas, vardas, pavardė	Pareigos	Telefonas (darbo)	Elektroninio pašto adresas
1	Dr. R.Mačianskienė	Laboratorijos vedėja	(37)302878	regina.macianskiene@lsmu.lt
2	Habil.dr. J.Jurevičius	-	-	-
3	Dr. Irma Martišienė	Docentė	(37)302878	irma.martisiene@lsmu.lt

Dalyko programos aprašas:

1. Dalyko programos poreikis.

LSMU Kardiologijos instituto Membranų biofizikos laboratorijos bazėje jau daug metų atliekami elektrofiziologiniai žmogaus ir gyvūnų širdies veiklos ir jos reguliavimo tyrimai. Laboratorijos darbuotojai dalyvavo įkūriant ląstelių kultūrų laboratoriją. Be to, nuolat vykdoma inovatyvių strategijų paieška/kūrimas ir jų pritaikymas elektrinių širdies signalų registravimui. LSMU KI yra sukurtas/pritaikytas darbui su eksperimentiniais gyvūnais naujas kompleksinis elektrinio signalo sklidimo širdyje registravimo metodas, apjungiantis optinę (su potencialui jautriais fluorescenciniais dažais) ir elektrinę veikimo potencialų registravimo skirtinguose širdies ląstelių sluoksniuose ir/ar transmuraliai (su stikliniais mikroelektrodais) metodikas. Tokie, vienu metu skirtingomis metodikomis užregistruotų elektrinių signalų palyginamieji tyrimai pirmą kartą leido ne tik tiksliai įvertinti bet ir teisingai interpretuoti elektrinės bangos sklidimo miokardu pokyčius širdies patologijos vystymosi metu. Laboratorijos bazėje pastoviai rengiami bakalaurai, magistrai ir doktorantai iš VDU, LSMU, VU ir KTU. Kad studentai ir jauni mokslininkai galėtų įsitraukti į mokslinę tyriamąją veiklą visų pirma jiems būtina suteikti naujausias teorines žinias apie inovatyvių strategijų ir neinvazinių tyrimo metodų paieškos ir/ar tobulinimo ypatumus bei jų pritaikymo tyrimams su eksperimentiniais gyvūnais pagrindus.

2. Dalyko programos tikslai.

Programos tikslas yra supažindinti doktorantus ir jaunus mokslininkus su visos širdies, jų audinių ir ląstelių biofizikiniais tyrimo metodais, šių tyrimų pritaikomumo klinikoje galimybių įvertinimas. Suteikti žinių apie ląstelių, audinių ar visos širdies (*Ex vivo* bei *In vivo*) tyrimo metodus, fluorescencinių dažų taikymą kraujagyslių vaizdinimui, optinio-mepingo (OM) tyrimo metodų galimybes patologinių situacijų tyrimuose (išemijos, aritmijų, T-bangos alternantų ir kt.). Supažindinti su naujų technologinių ir neinvazinių tyrimo metodų taikymo eksperimentiniuose (ir/ar klinikiniuose) tyrimuose galimybėmis.

3. <u>Dalyko programos sandara, turinys ir studijų metodai.</u>

Programos vykdymo metu studentai bus supažindinti su: 1) Ląstelių, jų išskyrimo ir audinių paruošimo pagrindais; 2) Pagrindiniais ląstelių, jų funkcijų fiziologinių bei patologinių būklių bei metabolizmo analizės metodais; 3) Biofizikiniais ir fluorescenciniais ląstelių bei jų kultūrų tyrimo metodais; 4) Optinio mepingo metodo tyrimų pagrindais vaizdinant kraujagysles, širdies elektrinę veiklą bei galimybėmis taikyti klinikinėje diagnostikoje.

Tam skirta: 40 val. paskaitų, 40 val. praktinių užsiėmimų ir seminarų ir 80 val. savarankiško darbo bei konsultacijų.

<u>Įvertinimas.</u> Suminis balas: 100% balo sudaro = 40% auditorinio darbo + 30% savarankiško darbo + 30% baigiamojo teorinio ir praktinio patikrinimo.

TEORINĖ DALIS (40 val.)

Eil. Nr.	Paskaitos pavadinimas	Trukmė val.	Dėstytojai
1.	Ląstelių kultūrų laboratorijos įrengimas: patalpos, indai, prietaisai ir biosaugos lygiai. Aseptinė darbo technika. Pirminės ir pastovios ląstelių kultūros bei linijos. Suspensinės ir adhezinės (lipnios) ląstelės. ES dokumentai, reglamentuojantys darbą su laboratoriniais gyvūnais ir ląstelių kultūromis.	2	R. Treinys
2.	Ląstelių kultūrų auginimas, skaičiavimas ir gyvybingumo tyrimai. Auginimo sąlygos: temperatūra, drėgmė, dujų sudėtis, terpės, jų komponentai ir priedai. Mikrobinis užterštumas, jo profilaktika ir likvidavimas. Ląstelių palaikymas, persėjimas, klonavimas, šaldymas ir saugojimas. Klinikinis ląstelių kultūrų pritaikymas.	2	R. Treinys
3.	Ląstelių membranos struktūra. Jonų difuzija ir transportas per membranas. Ląstelės membranos elektrinio aktyvumo prigimtis.	3	M. Almanaitytė
4.	Veikimo potencialas (VP) ir jo susidarymo mechanizmai įvairiose širdies dalyse. Sužadinimo slenkstis, fazės ir VP sklidimas. Širdies sujaudinimo genezė bei sklidimas miokarde.	3	M. Almanaitytė
5.	Ląstelių ir audinių tyrimai fluorescencinės mikroskopijos metodais. Fluorescuojantys dažai ir jų panaudojimas viduląstelinės jonų koncentracijos nustatymui.	2	I. Andriulė
6.	Vaskulinės sistemos vaizdinimo metodai izoliuotoje kraujagyslėje naudojant fluorescencinius dažus: dažų parinkimas ir paruošimas Metodo galimybės, trūkumai ir klinikinis pritaikymas.	2	I. Andriulė
7.	Natūraliose ląstelėse ir ląstelių linijose ekspresuotų joninių kanalų tyrimo metodai: specifika, panašumai ir skirtumai. Joninių srovių matavimo būdai taikant skirtingas lopinėlio („patch-clamp“) konfigūracijas (whole-cell, cell-attached, inside-out, outside-out).	2	M. Almanaitytė
8.	Fiksuotos srovės (current-clamp) metodo taikymas veikimo potencialo registravimui širdies ląstelėse. Kiti VP	2	R. Mačianskienė

	registravimo metodai audiniuose ir visoje širdyje (mikroelektrodai, plaukiojantys elektrodai, optrodai). Metodų palyginimas, signalo kokybė, privalumai ir trūkumai. VP formų įvairovė skirtinguose audiniuose bei laboratorinių gyvūnų modeliuose.		
9.	Langendorfo metodas širdies elektromechaniniam aktyvumui tirti: galimybės ir informatyvumas. Prieširdinis, epikardinis ir endokardinis dirginimas bei jo įtaka sužadinimo bangos sklidimui. Veikimo potencialų ir EKG registravimas.	2	R. Mačianskienė
10.	Įvadas į širdies elektrinio aktyvumo optinio kartografavimo (optical mapping) metodą. Optinio veikimo potencialo registravimas greitaeigėmis kameromis. Sklindančios sužadinimo bangos registravimas miokarde naudojant potencialui jautrius fluorescencinius dažus (mėlynai žalio ir artimo infraraudonajam spektro). Klinikinis pritaikymas.	3	R. Mačianskienė
11.	Sinchroniškas elektrinio (mikroelektrodais) ir optinio (fluorescencinio) signalų registravimas bei palyginamoji studija. Transmuralinis veikimo potencialų registravimas ir jo teikiama informacija. Elektrinio signalo sklidimo sutrikimus lemiantys veiksniai.	2	R. Mačianskienė
12.	Globali ir regioninė išemija: jos sukėlimas izoliuotoje laboratorinių gyvūnų širdyje. Išemijos sukeltų VP pokyčių registravimas optinio kartografavimo ir mikroelektrodų metodais. Optinių elektrolapių sudarymas bei vertinimas sveikoje ir išemijos pažeistoje širdyje.	2	I. Martišienė
13.	Kraujagyslių vaizdinimo metodai izoliuotoje širdyje naudojant fluorescencinius dažus: dažų parinkimas, paruošimas ir suleidimas. Metodo galimybės, trūkumai ir klinikinis pritaikymas.	2	I. Martišienė
14.	Dvigubas optinis kartografavimas (sinchroninis membraninio potencialo ir kalcio jonų pokyčio (V_m / Ca_T matavimas). Eksperimentinės sąlygos, viduląstelinio Ca^{2+} apykaitos anomalijų tyrimas, metodo privalumai ir trūkumai.	2	I. Martišienė
15.	Optinio kartografavimo taikymas T bangos alternantų (*angl.* T-wave alternans) mechanizmų tyrimui: išemijos ir reperfuzijos, beta adrenerginės stimuliacijos ir kalcio apykaitos sutrikimų įtaka. Klinikinis pritaikymas.	3	I. Martišienė
16.	Neeksplantuotos laboratorinių gyvūnų širdies (*in situ*) tyrimai. Optinio „mepingo“ metodo taikymas. Metodo privalumai ir trūkumai. Klinikinis pritaikymas.	2	I. Martišienė
17.	Ląstelių ir audinių fluorescenciniai tyrimai naudojant skirtingas optines sistemas: lazerius, šviesos diodus (LED) ir lempas. Jų pliusai bei minusai.	2	R. Treinys
18.	Audinių optinių savybių nustatymas fluorescenciniu mikroskopu taikant pažangias technikas: TIRF, FRET, FLIM, FLIP, FRAP. Metodų specifika ir tinkamas pasirinkimas tyrimų tikslams pasiekti.	2	R. Treinys

TEORINĖ – PRAKTINĖ DALIS (40 val.)

Eil. Nr.	Tema	Trukmė val.	Dėstytojai
1.	Eksperimentų planavimas. Pirminių ląstelių išskyrimas iš šiltakraujų laboratorinių gyvūnų. Išskirtų ląstelių palaikymas ir būklės vertinimas šviesinės mikroskopijos būdu.	3	I. Andriulė
2.	Fermentinis kardiomiocitų izoliavimas iš žmogaus širdies bioptatų (prieširdžių/skilvelių). Išskirtų ląstelių palaikymas ir būklės vertinimas šviesinės mikroskopijos būdu.	3	I. Andriulė
3.	Fiksuotos įtampos (voltage-clamp) metodo taikymas joninių srovių registravimui vienetinėse ląstelėse. Eksperimento protokolų programavimas, mikropipečių gamyba ir vidinių bei išorinių perfuzijos tirpalų parinkimas.	3	M. Almanaitytė
4.	Fluorescencinių dažų kardiomiocitų vaizdinimui parinkimas ir paruošimas. Fluorescencinės mikroskopijos taikymas elektrofiziologiniuose gyvųjų ląstelių tyrimuose (apoptozės, mitochondrijų nespecifinio pralaidumo poros atsidarymo vaizdinimas).	3	I. Andriulė
5.	Langendorfo perfuzinės sistemos paruošimas ir kalibravimas. Eksplantuotos širdies pajungimas. Epikardinio bei endokardinio elektrinio stimuliavimo elektrodų įvedimas ir EKG registravimas.	4	M. Almanaitytė
6.	Miografo perfuzinės sistemos paruošimas ir kalibravimas. Kraujagyslių funkcijos tyrimai naudojant izometrinės jėgos registravimo sistemą.	4	M. Almanaitytė
7.	Eksplantuotos širdies EKG bei elektrinių veikimo potencialų (epi- ir endokardinio) registravimas naudojant LabChart programinę įrangą. Pirminė duomenų analizė.	2	I. Martišienė
8.	Optinio kartografavimo duomenų analizė su Scroll (arba analogiška) programa: optinių veikimo potencialų aktyvacijos (sklidimo), amplitudės ir trukmės (APD) žemėlapių konstravimas bei interpretavimas.	2	M. Almanaitytė
9.	Širdies elektromechaninio aktyvumo tyrimo metodika: izoliuotų miokardo preparatų paruošimas, VP formos ir susitraukimo jėgos sinchroninis registravimas.	2	I. Martišienė
10.	Laboratorinių gyvūnų paruošimas eksperimentui: anestezija, eutanazija, krūtinės ląstos torakotomija, širdies išėmimas (kardioektomija). Kraujo surinkimas, perfuzinio tirpalo (NT) ir kraujo mišinio paruošimas, antikoaguliantų apskaičiavimas.	5	V. Zigmantaitė
11.	Neeksplantuotos širdies (*in situ* / *in vivo*) eksperimentiniai tyrimai: gyvūno anestezija, tracheotomija, dirbtinis plaučių vėdinimas. EKG, kraujospūdžio, širdies ritmo ir pulsinės bangos registravimas. Pirminė duomenų analizė.	5	V.Zigmantaitė
12.	Fluorescencinio mikroskopo paruošimas darbui. Tinkamas filtrų pasirinkimas, protokolų sukūrimas tikslams pasiekti.	2	I. Andriulė
13.	Ląstelių dažymas fluorescenciniais zondais: tirpalų ruošimas, inkubavimo protokolai. Vaizdo ryškumo ir fono (triukšmų) optimizavimas mikroskopu, statinių vaizdų ir vaizdo įrašų registravimas bei skaitmeninė analizė.	2	I. Andriulė
Viso:	40		

SAVARANKIŠKAS DARBAS (80 val.)

Literatūros studijavimas
Studentai savarankiškai studijuoja vadovėlius bei dėstytojų parinktus ir rekomenduojamus apžvalginius ir metodinius straipsnius kurso tematika ir seminarų metu pateikia trumpą jų analizę. Viena iš parinktų temų pateikiama seminare, kaip literatūros apžvalga-referatas. Viso šio darbo metu doktorantus konsultuoja dėstytojai. Studentai supažindinami su ES dokumentais, reglamentuojančiais darbą su laboratoriniais gyvūnais ir ląstelių kultūromis, tyrimų kokybės kontrole, jų prevencija. Studijų vertinimas vyksta egzamino metu, taip pat vertinamas parengtas referatas bei jo pristatymas.

REKOMENDUOJAMA LITERATŪRA

Eil. Nr.	Leidinio pavadinimas	Leidinio autorius	Leidimo metai ir leidykla
1.	Žmogaus fiziologija	Kėvelaitis E, Illert M, Humborn H ir kt.	KMU leidykla, Kaunas, 1999.
2.	Ion Channels	Aidley D.J., Stanfield R.	Cambrige University Press, New York, 1996.
3.	Potassium channels in normal and pathological conditions	Vereecke J., Bogaert P.P., Verdong F.	Leuven University Press, Leuven (Belgium), 1995.
4.	Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias	Carmeliet E.	*Physiol. Rev*. 79: 917-1017, 1999.
5.	Calcium channels: structure, function and classification	Perez-Reyes E, Schneider T.	*Drug Development Research* 33: 295-318, 1994.
6.	Animal Cell Culture: Principles and Practice (Praktinis vadovas ląstelių kultūroms)	LibreTexts Biology / Galyamova E.E.	LibreTexts Open Education, 2023 Nemokama knyga per LibreTexts
7.	Open Access Atlas of Cellular Imaging Techniques (Apima FRET, FLIM, FRAP, TIRF mikroskopiją)	Wheeler J. R., et al.	Frontiers in Physics, 2022. DOI: 10.3389/fphy.2022.912345
8.	Optical Mapping of Cardiac Electrophysiology: A Practical Guide	Laughner J. I., et al.	PubMed Central (atnaujinta 2012) Skaityti nemokamai PMC
9.	Ion channels of excitable membranes	Hille B.	3rd ed., Sinauer Associates, Sanderland, 2001
10.	Voltage-gated ion channels and hereditary disease	Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K	Physiol. Rev. 1999; 79; 4:1317-1372.
11.	Cardiac channelopathies	Marban E.	Nature. 2002; 415:213-218.
12.	Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias	Grant A.O.	Am.J.Med. 2001; 110:296-305.
13.	Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies	Jurkat-Rott K., Lehmann-Horn F.	J.Clin.Invest. 2005; 115:2000-2009.
14.	Dual Optical Mapping of Membrane Potential and Calcium Transient in Isolated Hearts	Morley G. E., et al.	Journal of Visualized Experiments (JoVE OA) 2019; DOI: 10.3791/59000
15.	Ląstelės biologija	Mildažienė V, Jarmalaitė S, Daugelavičius R.	2004; VDU leidykla, Kaunas.

16.	Heart Failure. Pathophysiology, Molecular Biology and Clinical Management	Katz. A.M	A Wolters Kluwer Company, Philadelphia, Baltimore, New York, London etc.
17.	The Langendorff Perfusion of the Isolated Heart	Sack M. N., et al.	Springer / Methods in Molecular Biology (PMC) 2020; Skaityti nemokamai PMC
18.	Cellular calcium imaging: so, what's new?	Brownlee C.	Trends in Cell biology, 2000, 10, 451-457.
19.	Changes in intracellular cAMP reported by a redistribution assay using a cAMP-dependent protein kinase-green fluorescent protein chimera	Almholta K., Tullinb S., Skyggebjergc O., Scuddera K., Thastrupd O., Terrya R.	Cellular Signalling, 2004, 907–920.
20.	Dual-colour imaging with GFP variants	Ellenberg J., Lippincott-Schwartz and J., Presley J.F.	Trends in Cell biology, 1999, 9, 52-56.
21.	FRET imaging	Jares-Erijman E.A., Jovin T.M.	Nature biotechnology. 21, 11:1387-1395.
22.	Using GFP in FRET-based applications	Pollok B.A., Heim R.	Trends in Cell biology, 1999, 9, 57-60.
23.	Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell	Bastiaens P.I.H., Squire A.	Trends in Cell biology, 1999, 9, 48-52
24.	Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells	White J., Stelzer E.	Trends in Cell biology, 1999, 9, 61-65
25.	Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy	Piston D.W.	Trends in Cell biology, 1999, 9, 66-69.
26.	Methods in Cellular Immunology	Fernandez-Botran R.	CRC Press, 2001.
27.	Practical Methods in Cardiovascular Research	Stefan Dhein, Friedrich Wilhelm Mohr, Mario Delmar	Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005
28.	Membrane Potential Imaging in the Nervous System and Heart eBook: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-17641-3.pdf	Editors: Marco Canepari Dejan Zecevic Oliver Bernus	Advances in Experimental Medicine and Biology 859 Springer 2015

NUMATOMŲ DĖSTYTOJŲ SĄRAŠAS:

1. Dalyko programoje dėstysiantys profesoriai arba vyriausieji mokslo darbuotojai:
   Dr. Regina Mačianskienė

2. Dalyko programoje dėstysiantys docentai arba vyresnieji mokslo darbuotojai:
   Dr. Irma Martišienė
   Dr. Rimantas Treinys
   Dr. Vilma Zigmantaitė

3. Kiti dalyko programos dėstytojai:
   Dr. Inga Andriulė
   Dr. Mantė Almanaitytė