



LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

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

ATNAUJINTA
2017 m. spalio 6 d.

LĄSTELIŲ KULTŪRŲ AUGINIMAS IR JŲ BIOFIZIKINIAI TYRIMO METODAI

DOKTORANTŪROS STUDIJŲ DALYKO PROGRAMA

Dalyko programos koordinatorius:

Kardiologijos instituto Membranųbiofizikos laboratorijos vedėjas habil.dr. J.Jurevičius

padalinio pavadinimas, vadovo pareigos, pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė parašas

Padaliniai, dalyvaujantys dalyko programoje:

KI Membranų biofizikos laboratorija, vedėjas habil. dr. Jonas Jurevičius

padalinio pavadinimas, vadovo pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė parašas

Dalyko programos duomenys

Mokslų sritis	Gamtos mokslai
Mokslo kryptis (kodas)	Biofizika – N 011
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	Habil.dr. J.Jurevičius	Laboratorijos vedėjas	(37)303877	Jonas.Jurevicius@ismuni.lt
2	Dr. R.Mačianskienė	vyriausiasis m.d.	(37)302878	Regina.Macianskiene@ismuni.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 darbu 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 tyrimą 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 klinikiuose) tyrimuose galimybėmis.

3. Dalyko programos sandara, turinys ir studijų metodai.

Programos vykdymo metu studentai bus supažindinti su: 1) Ląstelių, jų išskyrimo ir kultūrų auginimo pagrindais; 2) Pagrindiniais ląstelių, jų funkcijų fiziologinių bei pataloginių būklių bei metabolizmo analizės metodais; 3) Biofizikiniai ir fluorescenciniai 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.

4. Dėstytojai.

Dėstytojų sąrašas pateiktas priede Nr. 2.

5. Metodinis dalyko programos aprūpinimas.

Literatūros sąrašas pateiktas priede Nr.1.

Ivertinimas: 100% balo sudaro: 40% auditorinio darbo + 30% savarankiško darbo + 30% baigiamojo teorinio ir praktinio patikrinimo.

TEORINĖ DALIS (40 val.)

Eil. Nr.	Tema	Trukmė val.	Dėstytojai
1.	Ląstelių kultūros laboratorijos įrengimas. Patalpos, indai ir prietaisai, darbo saugos lygiai. Aseptinė darbo technika. Pirminės ir pastovios ląstelių kultūros. Ląstelių linijos. Suspensinės ir lipnios ląstelės. ES dokumentai, reglamentuojantys darbą su laboratoriniais gyvūnais ir ląstelių kultūromis.	2	J.Jurevičius R.Treinsys
2.	Ląstelių kultūrų auginimas, ląstelių skaičiavimas ir gyvybingumo tyrimai. Ląstelių auginimo sąlygos: temperatūra, drėgmė, dujų sudėtis, auginimo terpės, jų komponentai ir priedai. Ląstelių užterštumas mikroorganizmais. Užteršimų profilaktika ir likvidavimas. Ląstelių palaikymas, persėjimas, klonavimas, šaldymas ir saugojimas. Ląstelių kultūrų klinikinis pritaikymas.	2	J.Jurevičius R.Treinsys
3.	Ląstelių membranos struktūra. Jonų difuzija ir transportas per membranas. Ląstelės membranos elektrinio aktyvumo prigimtis.	2	J.Jurevičius
4.	Veikimo potencialas, jo susidarymo mechanizmas. Veikimo potencialo generavimo mechanizmai įvairiose širdies dalyse. Veikimo potencialo sužadavimo slenkstis, fazės. Veikimo potencialo sklidimas (Kabelio teorijos taikymas). Širdies sujaudinimo genezė ir sklidimas. Sujaudinimo patogenezė, ritmo sutrikimai.	2	J.Jurevičius
5.	Širdies sujaudinimo genezė ir sklidimas. Sujaudinimo patogenezė, ritmo sutrikimai.	2	J.Jurevičius
6.	Ląstelių/audinių tyrimai naudojant fluorescencinį tyrimo metodą. Fluorescuojantys dažai, fluorescencijos panaudojimas viduląstelinės jonų koncentracijos	2	J. Jurevičius

	nustatymui.		
7.	Natūraliose ląstelėse ir ląstelių linijose ekspresuotų skirtingų joninių kanalų tyrimo metodai. Šių tyrimų specifika, panašumai ir skirtumai. Joninių srovių matavimo būdai taikant skirtingas srovės per joninius kanalus matavimo konfigūracijas: visos ląstelės, prispaustos ląstelės, vidinės membranos išverstos į išorę ir išorinės membranos išverstos į vidų (angl. <i>whole-cell</i> , <i>cell-attached</i> , <i>inside-out</i> ir <i>outside-out</i>).	2	R.Mačianskienė
8.	Fiksuotos srovės metodo taikymas veikimo potencialo (VP) registravimui širdies ląstelėse. Kiti elektrofiziologiniai metodai naudojami VP registruoti (mikroelektrodai, plaukiojantys elektrodai, optrodai ir kt.) širdies ląstelėse, audiniuose ir visoje širdyje. Šių metodų panašumai ir skirtumai bei registruojamo signalo kokybė taikant skirtingą registravimo techniką (galimi plusai ir minusai). VP formų įvairovė ir informatyvumas skirtingų audinių bei skirtingų eksperimentinių gyvūnų širdies preparatuose.	2	R.Mačianskienė
9.	Langendorfo metodas širdies elektromechaniniam aktyvumui tirti. Šio metodo galimybės ir informatyvumas. Prieširdinis, epikardinis ir endokardinis dirginimai, jų įtaka elektrinio veikimo potencialo sklidimui. Veikimo potencialų ir EKG registracija bei šių parametrų teikiama informacija.	2	R.Mačianskienė
10.	Įvadas į širdies elektrinio aktyvumo kartografavimo metodą (angl. <i>optical mapping</i> ; OM). Optinio veikimo potencialo registravimas greitaeigėmis kameromis. OM taikymas sklindančios sužadavimo bangos registravimui miokarde. Optinio signalo registravimas mėlynai-žalio ir artimo raudonam spektrui potencialui jautriais dažiais. Panašumai, skirtumai, pritaikomumas Filtrai, jų parinkimas. Triukšmai ir juos įtakoiantys faktoriai. Optinio signalo filtravimas. OM klinikinis pritaikymas.	2	J.Jurevičius
11.	Fluorescencijos pagrindai: sužadinimas, absorbcija, emisija, „ <i>Stokes shift</i> “, refleksija ir tt. Fluorescenciniai dažai. Fluoroforai. Fluorescencijos nustatymas. Foninė fluorescencija. Fluorescencijos reikšmė.	2	J.Jurevičius
12.	Sinchroniškas elektrinio (mikroelektrodais) ir optinio (su potencialui jautriais fluorescenciniais dažiais) signalų registravimas, jų palyginamoji studija. Transmuralinis veikimo potencialų registravimas. Transmuralinio signalo informacija. Faktoriai sukeltantys elektrinio signalo sklidimo sutrikimus.	2	R.Mačianskienė
13.	Globali ir zoninė išemija. Jos sukėlimas ir ypatumai eksplantuotų laboratorinių gyvūnų širdyse. Išemijos sukeltų veikimo potencialų pokyčių registravimas OM būdu ir su mikroelektrodais (epikardinių ir endokardinių) informatyvumas, optinių elektrolapių sudarymas ir jų informatyvumas normos ir išemijos pakenktame audinyje.	2	I.Martišienė
14.	Kraujagyslių vaizdinimo metodas. Skirtingų fluorescencinių dažų taikymas: dažų parinkimas, paruošimas, tinkamas suleidimas. Šio metodo galimybės bei trūkumai. Klinikinis	2	I.Martišienė

	pritaikymas.		
15.	Dvigubas optinis „mepingas“ (Vm ir CaT). Sąlygos tinkamos tokiai optinio signalo registracijai. Viduląstelinio Ca ²⁺ jonų anomalijų tyrimas. Šio metodo privalumai ir trūkumai.	2	I.Martišienė
16.	Optinio „mepingo“ metodo taikymas T-bangos alternantų mechanizmų tyrimams: išemijos/reperfuzijos sukeltų, dėl beta-adrenerginės stimuliacijos, dėl kalcio jonų apykaitos sutrikimų. Klinikinis pritaikymas.	2	I.Martišienė
17.	Eksplantuotos gyvūno širdies perfuzija krauju. Perfuzijos krauju bei Tyrode tirpalu įpatumai ir svarba optinio „mepingo“ tyrimuose. Klinikinis pritaikymas.	2	R.Treinys
18.	Neeksplantuotos laboratorinių gyvūnų širdies (<i>in situ</i>) tyrimai. Optinio „mepingo“ metodo taikymas. Metodo privalumai ir trūkumai. Klinikinis pritaikymas.	2	R.Treinys
19.	Ląstelių/audinių fluorescenciniai tyrimai. Ląstelių/audinių tyrimai naudojant optinės sistemas: lazerius, šviestukus (angl. <i>led</i>), lempas. Šių optinių sistemų plusai ir minusai.	2	R.Treinys
20.	Audinių optinių savybių nustatymas fluorescenciniu mikroskopu naudojant įvairias technikas: TIRF, FRET, FLIM, FLIP, FRAP. Šių technikų panašumai ir skirtumai. Tinkamas pasirinkimas tyrimų tikslams pasiekti.	2	R.Treinys

TEORINĖ – PRAKTINĖ DALIS (40 val.)

Eil. Nr.	Tema	Trukmė val.	Dėstytojai
1.	Eksperimentų planavimas. Pirminių ląstelių skyrimas iš laboratorinių gyvūnų (šiltakraujų ir šaltakraujų). Fermentinis širdies ląstelių izoliavimas iš žmogaus širdies biopatų (prieširdžių ir skilvelių). Šių metodų specifika, skirtumai ir panašumai. Išskirtų ląstelių laikymas. Ląstelių būklės vertinimas mikroskopinės analizės būdu	5	R.Mačianskienė
2.	Fiksuotos įtampos metodo taikymas vienetinių ląstelių tyrimuose joninių srovių registravimui. Membranų laidumo tyrimai vienetinėse ląstelėse taikant „cell attached“ ir „on flow“ būdus. Membranų laidumo tyrimai ant išplėstos membranos gabalėlių taikant „inside-out“ ir „outside-out“ būdus. Tinkamų tyrimo protokolų paruošimas. Specifinis mikropipečių paruošimas tyrimų atlikimui ant audinių, vienetinių ląstelių bei membranos gabalėlių. Tinkamas vidinės/išorinės perfuzijos tirpalų parinkimas.	5	R.Mačianskienė
3.	Fluorescuojantys dažai, jų paskirtis ir pritaikomumas. Fluorescencinių dažų kardiomiocitų vaizdinimui parinkimas. Fluorescencinės mikroskopijos tyrimo metodų panaudojimas elektrofiziologiniuose tyrimuose darbui su gyvosiomis ląstelėmis: ląstelių apoptozės, nespecifinio pralaidumo poros ir kt. vaizdinimas).	5	J. Jurevičius
4.	Langendorfo perfuzinės sistemos paruošimas. Širdies susitraukimo sustabdymas. Elektrodo įvedimas	8	R.Mačianskienė I.Martišienė

	skirtingiems dirginimams atlikti (iš epikardo ir iš endokardo pusių). EKG registracija.		
5.	Eksplantuotos širdies EKG registravimas naudojant LabChart7 programą. Elektrinių veikimo potencialų (epikardinio ir endokardinio) registravimas su LabChart7 programa. Duomenų analizavimas.	2	I.Martišienė
6.	Žemėlapių konstravimas su Scroll programa: optinių veikimo potencialų aktyvacijos laikų, amplitudės ir trukmės. Žemėlapių skaitymas.	3	I.Martišienė
7.	Globalios ir zoninės išemijos sukėlimas (perrišant ar užspaudžiant kraujagyslę), ypatumai, skirtumai, privalumai. Reperfuzija.	2	I.Martišienė
8.	Elektromechaninio aktyvumo tyrimo metodika. Izoliuotų širdies preparatų paruošimas. Veikimo potencialų ir susitraukimo registravimas.	2	I.Martišienė
9.	Laboratorinių gyvūnų paruošimas, antistresantų ir anestezijos suleidimas, gyvūno užmigdyimas, krūtinės ląstos atvėrimas ir širdies išėmimas. Kraujo surinkimas. Perfuzija krauju ir su Tyrode tirpalu. Kraujo perfuzijos tirpalo paruošimas: surinkimas, antikoguliantų paskaičiavimas ir suleidimas, plazmos atskyrimas ir tt.	2	R.Treinys
10.	Neeksplantuotos širdies (<i>in situ</i>) eksperimentiniai tyrimai. Laboratorinių gyvūnų paruošimas antistresantų ir anestezijos parinkimas ir suleidimas, intubacija, dirbtinio kvėpavimo palaikymas, krūtinės ląstos atvėrimas, širdies pajungimas prie dirbtinės perfuzijos. Kraujo surinkimas. Perfuzija krauju ir su Tyrode tirpalu.	2	R.Treinys
11.	Fluorescencinio mikroskopo paruošimas darbui. Tinkamas filtrų pasirinkimas, protokolų sukūrimas tyrimų tikslams pasiekti.	2	R.Treinys
12.	Laštelių dažymas. Dažų parinkimas ir gamyba. Dažymo būdai. Ryškumo bei fono parinkimas naudojant fluorescencinį mikroskopą. Dažytų laštelių nuotraukų ir filmų registravimas bei kaupimas duomenų bazėje. Užregistruotų vaizdų analizavimas.	2	R.Treinys
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 laštelių 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 kiti.	KMU leidykla, Kaunas, 1999.
2.	Ion Channels.	Aidley D.J., Stanfield P.R.	Cambridge University Press, New York, 1996.
3.	Potassium channels in normal and pathological condotions.	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.	<i>Physiol. Rev.</i> 79: 917-1017, 1999.
5.	Calcium channels: structure, function and classification.	Perez-Reyes E., Schneider T.	<i>Drug Development Research</i> 33: 295-318, 1994.
6.	Molecular biology of the cell.	Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.	Garland Publishing, Inc., New York, 1983.
7.	In search of the physical basis of life.	Ling G.N.	Plenum Press, New York, 1984.
8.	Potassium channels and their modulators.	Evans J.M, Hamilton T.C., Longman S.D., Stemp G.	Taylor & Francis, London, 1996.
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	<i>Physiol. Rev.</i> 1999; 79; 4:1317-1372.
11	Cardiac channelopathies.	Marban E.	<i>Nature.</i> 2002; 415:213-218.
12	Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias.	Grant A.O.	<i>Am.J.Med.</i> 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	Inherited disorders of voltage-gated sodium channels.	George A.L.	J.Clin.Invest. 2005; 115:1990- 1999.
15	Lašteles biologija.	Mildažienė V., Jarmalaitė S.,Daugelavičius R.	2004; VDU leidykla, Kaunas.
16	Heart Failure. Pathophysiology, Molecular Biology and Clinical Management.	A.M.Katz.	A Wolters Kluwer Company, Philadelphia, Baltimore, New York, London etc.
17	Physiology of the heart.	A.M.Katz.	A Wolters Kluwer Company, Philadelphia, Baltimore, New York, London etc.
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.	Almholt 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

<http://www.bmb.psu.edu/courses/biotc489/default.htm>
<http://falcon.jmu.edu/~ramseyil/cellbiology.htm>
<http://www.cellsalive.com/>
<http://homepages.gac.edu/~cellab/contents.html>
<http://www.measurementuncertainty.org/>
http://www-2.cs.cmu.edu/~webwatch/industry_structural_w_images.html
<http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>
<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/>
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfconfiguration.html>
http://en.wikipedia.org/wiki/Total_internal_reflection_fluorescence_microscope
<http://www.forumsci.co.il/HPLC/topics.html>
<http://www.chemistry.wustl.edu/~msf/damon/index.html>
<http://www.fz-borstel.de/flowcytes/internet/data/sitelink.htm>
<http://meds.queensu.ca/qcri/flow/cr-fc-getstarted.htm>
http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/support/training/online/
<http://www.probes.com>
<http://flowcyt.cyto.purdue.edu/flowcyt/books/bookindx.htm>
[Intro_to_Flow_Cytometry.pdf](#)
<http://www.uic.edu/classes/phar/phar331/mankin/>
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>

NUMATOMŲ DĖSTYTOJŲ SĄRAŠAS:

1. Dalyko programoje dėstysiantys profesoriai arba vyriausieji mokslo darbuotojai:
Habil.dr. Jonas Jurevičius,
Dr. Regina Mačianskienė
2. Dalyko programoje dėstysiantys docentai;
-
3. Kiti dalyko programos dėstytojai:
Dr. Irma Martisienė,
Dr. R. Treinys