



LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

KAUNO MEDICINOS UNIVERSITETAS

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

ATNAUJINTA
2013 m. gruodžio 20 d.

**L STELI KULTŪRŲ AUGINIMAS IR JŲ BIOFIZIKINIAI TYRIMO
METODAI**

DOKTORANTŲ ROS STUDIJŲ DALYKO PROGRAMA

Dalyko programos koordinatorius:

Kardiologijos instituto Membran biofizikos laboratorijos ved. jas habil.dr. J.Jurevičius

padalinio pavadinimas, vadovo pareigos, pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavard _____ parašas

Padaliniai, dalyvaujantys dalyko programoje:

KI Membran biofizikos laboratorija, ved. jas habil. dr. Jonas Jurevičius

padalinio pavadinimas, vadovo pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavard _____ parašas

Kaunas, 2013

Dalyko programos duomenys

Moksl sritis	Biomedicinos mokslai
Moksl kryptis (kodas)	Biofizika – 02B
Dalyko pavadinimas	L steli kult r auginimas ir j biofizikiniai tyrimo metodai
Programos apimtis	160 val. (6 ECTS)
Paskaitos	40 val.
Seminarai	40 val.
Savarankiškas darbas	80 val.

Dalyko programos rengimo grup

Eil. Nr.	Pedagoginis vardas, vardas, pavard	Pareigos	Telefonas (darbo)	Elektroninio pašto adresas
1	Habil.dr. J.Jurevi ius	lab.ved jas	8 37 303877	Jonas.Jurevicius@ismuni.lt
2	Dr. R.Ma ianskien	vyriausia m.d.	8 37 302878	Regina.Macianskiene@ismuni.lt

Dalyko programos aprašas:

1. **Dalyko programos poreikis.** KMU Kardiologijos instituto Membran biofizikos laboratorijos baz je sisavinant ES strukt rini fond l šas šiuo metu yra kuriamas L steli kult r centras. Taip pat laboratorijoje jau daug met atliekami elektrofiziologiniai žmogaus ir gyv n širdies veiklos ir jos reguliavimo tyrimai. Eksperimentai atliekami su širdies raumenimis (susitraukimo j gos tyrimai) bei izoliuotais miocitais (jonini srovi tyrimai). Laboratorijos baz je pastoviai rengiami bakalaurai, magistrai ir doktorantai daugiausia iš VDU, o taip pat iš LSMU, VU ir KTU. Kad studentai ir jauni mokslininkai gal t sitraukti kuriamo L steli kult r centro veikl bei gal t atlikti mokslinius tyrimus vis pirma jiems b tina suteikti teorines žinias apie l steli kult r auginim ir j tyrimo metodus.

2. **Dalyko programos tikslai.** Programos tikslas yra supažindinti doktorantus ir jaunus mokslininkus su l steli ir audini kult r *in vitro* auginimo pagrindais bei j klinikiniu pritaikymu. Suteikti žini apie l steli , audini ar visos širdies (*Ex vivo* bei *In vivo*) tyrimo metodus, fluorescencini daž taikym kraujagysli vaizdinimui, optinio-mepingo tyrimo metod galimybes patologini situacij tyrimuose (išemijos, aritmij , T-bangos alternant ir kt.). Doktorant ros programa pagerins studij kokyb prioritetin je MTEP srityje (“Genomika ir biotechnologijos sveikatai ir žem s kiui”).

3. **Dalyko programos sandara, turinys ir studij metodai.** Programos vykdymo metu studentai bus supažindinti su: 1) L steli ir audini kult r auginimo pagrindais; 2) Pagrindiniais l steli , j funkcij fiziologini bei patologini b kli bei metabolizmo analiz s metodais; 3) Biofizikiniais bei fluorescenciniais l steli bei j kult r tyrimo metodais; 4) Optinio mepingo metodo tyrim pagrindais vaizdinant kraujagysles, širdies veikl bei galimyb mis taikyti klinikin je diagnostikoje.

Tam skirta 40 val. paskait , 40 val. praktini užsi mim ir seminar bei 80 val. savarankiško darbo ir konsultacij .

4. **D stytojai.** D stytoj s rašas pateiktas priede Nr. 2.

5. **Metodinis dalyko programos apr pinimas.** Literat ros s rašas pateiktas priede Nr.1.

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

TEORIN DALIS (40 val.)

Eil. Nr.	Tema	Trukm val.	D stytojai
1.	L steli kult ros laboratorijos rengimas. Patalpos, indai ir prietaisai, darbo saugos lygiai. Aseptin darbo technika. Pirmin s ir pastovios l steli kult ros. L steli linijos. Suspensin s ir lipnios l stel s. ES dokumentai, reglamentuojantys darb su laboratoriniais gyv nais ir l steli kult romis.	2	J.Jurevi ius R.Treinys
2.	L steli kult r auginimas, l steli skai iavimas ir gyvybingumo tyrimai. L steli auginimo s lygos: temperat ra, dr gm , duj sud tis, auginimo terp s, j komponentai ir priedai. L steli užterštumas mikroorganizmais. Užteršim profilaktika ir likvidavimas. L steli palaikymas, pers jimas, klonavimas, šaldymas ir saugojimas. L steli kult r klinikinis pritaikymas.	2	J.Jurevi ius R.Treinys
3.	L steli membranos strukt ra. Jon difuzija ir transportas per membranas. L stel s membranos elektrinio aktyvumo prigimtis.	2	J.Jurevi ius
4.	Veikimo potencialas, jo susidarymo mechanizmas. Veikimo potencialo generavimo mechanizmai variose širdies dalyse. Veikimo potencialo sužadinimo slenkstis, faz s. Veikimo potencialo sklidimas (Kabelio teorijos taikymas). Širdies sujaudinimo genez ir sklidimas. Sujaudinimo patogenez , ritmo sutrikimai.	2	J.Jurevi ius
5.	Širdies sujaudinimo genez ir sklidimas. Sujaudinimo patogenez , ritmo sutrikimai.	2	J.Jurevi ius
6.	L steli /audini tyrimai naudojant fluorescencin tyrimo metod . Fluorescuojantys dažai, fluorescencijos panaudojimas vidul stelin s jon koncentracijos nustatymui.	2	J. Jurevi ius
7.	Nat raliuose l stel se ir l steli linijose ekspresuot skirting jonini kanal tyrimo metodai. Ši tyrim specifika, panašumai ir skirtumai. Fiksuotos tampos metodo taikymas srovi per joninius kanalus tyrimams atlikti. Srovi matavimo b dai: “whole-cell”, “cell-attached”, “inside-out” ir “outside-out” konfig racijos.	2	R.Ma ianskien
8.	Fiksuotos srov s metodo taikymas veikimo potencialo matavimams dirgliose l stel se. Kiti metodai naudojami veikimo potencialui registruoti (mikroelektrodai, plaukiojantys elektrodai, optrodai ir kt.) širdies l stel se, audiniuose ir visoje širdyje. Ši metod panašumai ir skirtumai bei registruojamo signalo kokyb taikant skirting registravimo technik (galimi plusai ir minusai). Veikimo potencial form vairov bei informatyvumas skirting audini ir skirting eksperimentini gyv n širdies preparatuose.	2	R.Ma ianskien
9.	Langendorfo metodas širdies elektromechaniam	2	R.Ma ianskien

	aktyvumui tirti. Šio metodo galimybės ir informatyvumas. Epikardinis ir endokardinis dirginimai. Veikimo potencial ir EKG registracija bei ši parametrų teikiama informacija.		
10.	vadas širdies elektrinio aktyvumo kartografavimo metod (angl. <i>Optical mapping</i>). Optinio veikimo potencialo registravimas greitais kameromis. Optinio „mepingo“ taikymas sklindančios sužadinto bangos registravimui miokarde. Optinio signalo registravimas mėlynai-žalio ir artimo raudonam spektrui potencialui jautriais dažais. Panašumai, skirtumai, pritaikymas. Filtrai, jų parinkimas. Triukšmai ir juos takojantys faktoriai. Optinio signalo filtravimas. Optinio „mepingo“ kliniškinis pritaikymas.	2	J.Jurevičius
11.	Fluorescencijos pagrindai: sužadinimas, absorbcija, emisija, „Stokes shift“, refleksija, „fotobleaching“ (<i>photobleaching</i>) ir tt. Fluorescenciniai dažai. Fluoroforai. Fluorescencijos nustatymas. Foninė fluorescencija. Fluorescencijos reikšmės.	2	J.Jurevičius
12.	Sinchroniškas elektrinio (mikroelektrodais) ir optinio (optiniu „mepingu“) signalo registravimas, jų palyginamoji studija. Transmuralinis veikimo potencialo registravimas. Transmuralinio signalo informacija. Galimi faktoriai sukiantys optinio signalo pakitimus: absorbcija, „skatteringas“, naudojama širdies-perfuzijos sistema (tirpalas ar kontaktuojanti su oru), medžiagos stabdančios širdies susitraukimą ir tt.	2	R.Mačianskienė
13.	Globali ir zoninė išemija. Jos sukūlimas ir ypatumai eksplantuoti laboratorini gyvūnų širdyse. Išemijos sukelti pokyčiai registravimas optinio „mepingo“ ir mikroelektrodiniais metodais. Optiniai ir elektriniai (epikardiniai ir endokardiniai) veikimo potencialo informatyvumas, optinio signalo žemlapiai išemijos pakenktame audinyje.	2	I.Martišienė
14.	Kraujagyslių vaizdinimo metodas. Skirtingi fluorescenciniai dažai taikymas: dažų parinkimas, paruošimas, tinkamas suleidimas. Šio metodo galimybės bei trūkumai. Kliniškinis pritaikymas.	2	I.Martišienė
15.	Dvigubas optinis „mepingas“ (Vm ir CaT). Šios lygos tinkamos tokiai optinio signalo registracijai. Vidulinio Ca ²⁺ jonų anomalijų tyrimas. Šio metodo privalumai ir trūkumai.	2	I.Martišienė
16.	Optinio „mepingo“ metodo taikymas T-bangos alternant mechanizmų tyrimams: išemijos/reperfuzijos sukelti, dėl beta-adrenerginių stimuliacijos, dėl kalcio jonų apykaitos sutrikimų. Kliniškinis pritaikymas.	2	I.Martišienė
17.	Eksplantuotos gyvūnų širdies perfuzija krauju. Perfuzijos krauju bei Tyrode tirpalu ypatumai ir svarba optinio „mepingo“ tyrimuose. Kliniškinis pritaikymas.	2	R.Treinys
18.	Neeksplantuotos laboratorini gyvūnų širdies (<i>in situ</i>) tyrimai. Optinio „mepingo“ metodo taikymas. Metodo privalumai ir trūkumai. Kliniškinis pritaikymas.	2	R.Treinys
19.	L-stelių/audinių fluorescenciniai tyrimai. L-stelių/audinių tyrimai naudojant optines sistemas: lazerius, šviestukus	2	R.Treinys

	(angl. <i>led</i>), lempas. Ši optini sistem pliusai ir minusai.		
20.	Audini optini savybi nustatymas fluorescenciniu mikroskopu naudojant varias technikas: TIRF, FRET, FLIM, FLIP, FRAP. Ši technik panašumai ir skirtumai. Tinkamas pasirinkimas tyrim tikslams pasiekti.	2	R.Treinys

TEORIN – PRAKTIN DALIS (40 val.)

Eil. Nr.	Tema	Trukm val.	D stytojai
1.	Ekspertiment planavimas. Pirmini l steli skyrimas iš laboratorini gyv n (šiltakrauj ir šaltakrauj). Fermentinis širdies l steli izoliavimas iš žmogaus širdies bioptat (prieširdži ir skilveli). Ši metod specifika, skirtumai ir panašumai. Išskirt l steli laikymas. L steli b kl s vertinimas mikroskopin s analiz s b du	5	R.Ma ianskien
2.	Fiksuotos tampos metodo taikymas vienetini l steli tyrimuose jonini srovi registravimui. Membran laidumo tyrimai vienetin se l stel se taikant „cell attached“ ir „on flow“ b dus. Membran laidumo tyrimai ant išpl štos membranos gabal li taikant „inside-out“ ir „outside-out“ b dus. Tinkam tyrimo protokol paruošimas. Specifinis mikropipe i paruošimas tyrim atlikimui ant audini , vienetini l steli bei membranos gabaleli . Tinkamas vidin s/išorin s perfuzijos tirpal parinkimas.	5	R.Ma ianskien
3.	Fluorescuojantys dažai, j paskirtis ir pritaikomumas. Fluorescencini daž kardiomiocit vaizdinimui parinkimas. Fluorescencin s mikroskopijos tyrimo metod panaudojimas elektrofiziologiniuose tyrimuose darbui su gyvosiomis l stel mis: l steli apoptoz s, nespecifinio pralaidumo poros ir kt. vaizdinimas).	5	J. Jurevi ius
4.	Langendorfo perfuzin s sistemos paruošimas. Širdies susitraukimo sustabdymas. Elektrod vedimas skirtingiems dirginimams atlikti (iš epikardo ir iš endokardo pusi). EKG registracija.	6	R.Ma ianskien I.Martišien
5.	Eksplantuotos širdies EKG registravimas naudojant LabChart7 program . Elektrini veikimo potencial (epikardinio ir endokardinio) registravimas su LabChart7 programa. Duomen analizavimas.	2	I.Martišien
6.	Žem lapi konstravimas su Scroll programa: optini veikimo potencial aktyvacijos laik , amplitud s ir trukm s. Žem lapi skaitymas.	3	I.Martišien
7.	Globalios ir zonin s išemijos suk limas (perrišant ar užspaudžiant kraujagysl), ypatumai, skirtumai, privalumai. Reperfuzija.	2	I.Martišien
8.	Elektromechaninio aktyvumo tyrimo metodika. Izoliuot širdies preparat paruošimas. Veikimo potencial ir susitraukimo registravimas.	2	I.Martišien
9.	Eksplantuotos širdies optinio „mepingo“ tyrimai. Laboratorini gyv n paruošimas, antistresant ir anestezijos suleidimas, gyv no užmigdymas, kr tin s l stos	2	R.Treinys

	atv rimas ir širdies išmimas. Kraujo surinkimas. Perfuzija krauju ir su Tyrode tirpalu.		
10.	Kraujo perfuzijos tirpalo paruošimas: surinkimas, antikoagulant paskaiavimas ir suleidimas, plazmos atskyrimas ir tt.	2	R.Treinys
11.	Neeksplantuotos širdies (<i>in situ</i>) optinio „mepingo“ tyrimas. Laboratorini gyvūn paruošimas antistresant ir anestezijos parinkimas ir suleidimas, intubacija, dirbtinio kvėpavimo palaikymas, krūtinės ląstos atvrimas, širdies pajungimas prie dirbtinės perfuzijos. Kraujo surinkimas. Perfuzija krauju ir su Tyrode tirpalu.	2	R.Treinys
12.	Fluorescencinio mikroskopo paruošimas darbui. Tinkamas filtr pasirinkimas, protokol surinkimas tyrim tikslams pasiekti.	2	R.Treinys
13.	Ląstelių dažymas. Daž parinkimas ir gamyba. Dažymo būdai. Ryškumo bei fono parinkimas naudojant fluorescencinį mikroskopą. Dažytų ląstelių nuotraukų ir film registravimas bei kaupimas duomenų bazėje. Užregistruot vaizd 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 trumpąją 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, tyrimo 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.	Kvelaitis 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 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.	<i>Physiol. Rev.</i> 79: 917-1017, 1999.
5.	Calcium channels: structure,	Perez-Reyes E., Schneider T.	<i>Drug</i>

	function and classification.		<i>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	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	Inherited disorders of voltage-gated sodium channels.	George A.L.	J.Clin.Invest. 2005; 115:1990-1999.
15	L stel s biologija.	Mildažien V., Jarmalait S.,Daugelavi ius 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

<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>

NUMATOM D STYTOJ S RAŠAS:

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