**НАВЧАЛЬНО-ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН ДИСЦИПЛІНИ**

**Лекції (усього 34 год.) і**

**самостійні роботи (усього 57 год.)**

**Змістовий модуль №1: Теоретичні основи біоелектрогенезу**

**1.1. Із історії біоелектрики – 3 год.**

Досліди Гальвані. Перші вимірювання потенциалу пошкодження, струмів спокою та струмів дії. Розвиток методів вимірювання біопотенціалів. Теорії виникнення біоелектричних явищ.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (4 год.)***

*1. Експерименти Карло Маттеучі.*

*2. Дифузійна теорія В.Ю. Чаговця виникнення демаркаційного потенціалу.*

*3. Теорія Дюбуа-Раймона, потенціал спокою і потенціал дії.*

*4. Досліди С. Рінгера.*

**1.2. Мембранна теорія – 3 год.**

Етапи становлення та розвитку мембранної теорії біоелектрогенезу. Структура, функція та властивості біомембран. Підтримання іонного гомеостазу клітини: активні транспортери та іонні канали. Іонна проникність біомембран. Ряди Ейзенмана. Рівняння Нернста. Природа потенціалу спокою та потенціалу дії. Теорія постійного поля. Рівняння Голдмана-Ходжкіна-Каца. Механизми селективності іонних каналів.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (5 год.)***

*1. Реотом Ю. Бернштейна, вимірювання швидкості розповсюдження ПД.*

*2. Ліпоідна теорія мембран Ч. Овертона.*

*3. Розвиток уявлень про іонну вибірковість мембран та іонні канали.*

*4. Досліди Б. Хілле.*

*5. Селективність натрієвих, калієвих і кальцієвих каналів.*

**Змістовий модуль №2: Методи електрофізіології**

**2.1. Металеві електроди – 1 год.**

Фізхімія металів в електролітах. Металеві електроди, їх призначення та електрохімічні властивості. Зворотні електроди. Поляризація електродів. Рухливість іонів в электролітах. Соляні містки та дифузійні потенціали. Індиферентний електрод та способи його виготовлення.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Хлорсрібний електрод, електрохімічні реакції, які на ньому відбуваються.*

*2. Сфери використання металевих електродів у біології і медицині.*

**2.2. Внутрішньоклітинні вимірювання електричних потенціалів – 1 год.**

Металеві мікроелектроди (МЕ): області іх вживання та недоліки. Виготовлення металевих МЕ. Скляні мікропіпетки та МЕ їх принципові відмінності. Структура та фізичні властивості скла. Типи скла. Фізико-хімічні властивості поверхні розділу скло/електроліт. Електричні параметри скляного МЕ та його еквівалентна схема. Типи вольт-амперних характеристик скляних МЕ. Заповнення скляних МЕ. Механічне та термічне загострення скляних МЭ. Багатоканальні скляні МЕ. Конструкція утримувача МЕ.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Природа виникнення потенціалу кінчика скляного МЕ.*

*2. Кузня Фонбрюна для виготовлення скляних мікроінструментів.*

**2.3. Апаратне забезпечення вимірювання біоелектричних сигналів – 1 год.**

Загальна блок схема електрофізіологічної установки. Апаратура та прилади, які застосовуються в сучасних електрофізіологічних дослідженнях. Основні вимірювальні схеми. Блок схема електрофізіологічного підсилювача. Попередні підсилювачі, їх призначення та основні вимоги.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Операційні підсилювачі (ОП) та їх параметри.*

*2. Основні електрофізіологічні схеми на базі ОП.*

**2.4. Метод фіксації струму – 1 год.**

Еквівалентна електрична схема клітини. Способи пропускання фіксованого струму через мембрану. Поняття послідовного опору та його компенсація. Схема класичного експерименту Ходжкіна-Хакслі на аксоні кальмара. Типи експериментів, які проводяться методом фіксації струму та їх інтерпретація.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Постсинаптичні струми та потенціали.*

*2. Механізм виникнення ПД.*

**2.5. Метод фіксації потенціалу – 1 год.**

Критерії адекватності фіксації потенціалу. Просторова та часова фіксація. Роль послідовного опору при фіксації потенціалу. Одно- та двох-МЕ фіксація. Електронні схеми фіксації потенціалу. Області застосування методу фіксації потенціалу.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Електронна компенсація послідовного опору.*

*2. Пасивні заходи по зменшенню послідовного опору.*

**2.6. Обробка даних, одержуваних методом фіксації потенціалу – 1 год.**

Способи розділення загального трансмембранного іонного струму на компоненти. Вольт-амперні характеристики (ВАХ) мембрани, миттєві ВАХ, струми втрат. Аналітичний опис ВАХ. Поняття про активацію, деактивацію та інактивацію струмів та відповідних їм каналів. Хвостовий струм. Часова та стаціонарна активаці та інактивацяя струмів, способи їх вимірбвання та опису. Віконний струм. Воротні струми. Опис фармакологічної чутливості іонних струмів. Ізотерма Ленгмюра, рівняння Хіла.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (1 год.)***

*1. Експериментальні протоколи, які застосовуються для визначення біофізичних характеристик мембранних струмів.*

*2. Оцінка потенціалзалежності дії фармакологічних речовин на іонні струми.*

**2.7. Фіксація потенціалу на багатоклітинних препаратах – 1 год.**

Тканини які утворюють клітинний синцитій. Щільові контакти. Поодинокий та подвійний сахарозний місток. Практичні обмеження та недоліки методів сахарозного містка. Способи врахування та пониження похибок методів сахарозного містка.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Конексини, їх структура і функція.*

*2. Еквівалентна електрична схема багатоглітинного препарату.*

**2.8. Метод внутрішньоклітинної перфузії – 1 год.**

Поєднання методів фіксації потенціалу та внутрішньоклітинної перфузії. Ряд сприятливих внутршньоклітинних аніонів. Внутрішньоклітинна перфузія на основі пластикових мікропіпеток. Виготовлення пластикових мікропипеток. Послідовний опір. Модифікації метода внутрішньоклітинної перфузії. Переваги та недоліки методу фіксації потенціалу в умовах внутрішньоклітинної перфузії.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Способи збільшення адгезії клітин до пластику.*

*2. Теоретичні основи аналізу шумів з метою визначення характеристик поодиноких каналів.*

**2.9. Метод "patch-clamp" – 1 год.**

Мікроэлектроди та мікропіпетки. Метод внутрішньоклітинної перфузії з застосуванням скляних мікропіпеток як попередник методу "patch-clamp". Основні характеристики та переваги методу "patch-clamp". Шляхи досягнення гігаомних контактів між кінчиком мікропіпетки та мембраною. Конфігурації методу "patch-clamp". Оцінка ефективності внутрішньоклітинного діалізу в конфігурації "whole-cell". Поняття про “перфорований” "patch-clamp".

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Застосування антибіотиків для “перфорації” мембрани.*

*2. Геометрія скляних мікропіпеток та способи її оптимізації.*

**2.10. Особливості електронної схеми методу "patch-clamp" – 1 год.**

Претворювач струм-напруга, як основний елемент попереднього підсилювача. Вимоги до опору зворотнього звязку. Корекція полоси пропускання електронної схеми. Компенсація швидких та повільних перехідних процесів. Компенсація послідовного опору.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (1 год.)***

*1. Комерційно доступні підсилювачі "patch-clamp", їх переваги та недоліки.*

**2.11. Реєстрація активності поодиноких каналів – 1 год.**

Поняття про шуми та способи їх оцінки. Джерела шуму в методі "patch clamp" та шляхи підвищення його чутливості.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (1 год.)***

*1. Способи покращення електричних параметрів мікропіпеток.*

**2.12. Компютерна обробка даних по активності поодиноких каналів – 1 год.**

Пороговий детектор подій. Вплив полоси пропускання та частоти оцифровки на детекцію подій. Одержання часових та амплитудних характеристик поодиноких каналів. Пачкова активність каналів. Відповідність характеристик макроскопічних струмів та поодиноких каналів. Створення кінетичної схеми роботи каналу по даним його елементарної активності.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (1 год.)***

*1. Коммерційна програма для збору та обробки даних по активності поодиноких каналів – pCLAMP.*

**Змістовий модуль №3: Методи дослідження рекомбінантних каналів та рецепторів**

**3.1. Молекулярно білогічні підходи до дослідження іонних каналів та рецепторів – 1 год.**

Генетичний код та його звязок з первинною структурою білка. Біохімічне виділення мембранних білків. Способи клонування іонних каналів та рецепторів. Бібліотеки геномної та комплементарної ДНК. Вектори ДНК.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (3 год.)***

*1. Екзони та інтрони геномної ДНК*

*2. Сплайсинг мРНК.*

**3.2. Попередній аналіз клонованих каналів та рецепторів – 1 год.**

Виведення первинної структури клонованого канала. Профіль гідропатичності та його звязок з топологією мембранного білка. Ідентифікація транс- та позамембранних ділянок. Змійчасті диаграми. Дендрограми гомологічних каналів.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (3 год.)***

*1. Природа різноманіття однотипних каналів: гомологічні гени, альтернативний сплайсинг, редагування мРНК.*

*2. Метод замінених цистеїнів.*

**3.3. Структурно-функциональний аналіз клонованих каналів та рецепторів – 2 год.**

Основні родини клонованих каналів та рецепторів. Гомо- та гетеромультимерні канали. Ідентифікація функціонально важливих ділянок. Внесення мутацій та функціональна експресія клонованих каналів та рецепторів.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Основні класи та родини іонних каналів.*

*2. Пороутворювальні та службові субодиниці каналів.*

*3. Структурні ознаки потенціалкерованих каналів.*

**3.4. Характеристика систем для функциональної експресії экзогенних каналів та рецепторів – 1 год.**

Іморталізовані клітинні лінії, їх одержання та культивування. Ооцити шпорцевої жаби *Xenopus laevis*, їх морфологія, процедура виділення та культивування.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (1 год.)***

*1. Критерії вибору клітинних ліній, основні світові банки клітинних ліній.*

*2. Особливості лабораторного утримання шпорцевої жаби* Xenopus laevis*.*

**3.5. Методи введення генетичного материалу в експресійні системи – 2 год.**

Способи трансфекції екзогенної ДНК в клітинні лінії. Маркери трансфекції. Транзієнтна та стабільна трансфекція. Інжекція сумарної мРНК, виділеної з різних тканин, та комплементарної мРНК клонованих каналів в ооцити *Xenopus*.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Зелений флуорисцентний білок та його похідні.*

*2. Умовна трансфекція.*

**3.6. Электрофізіологічні методи дослідження експресованих каналів та рецепторів – 1 год.**

Електричні параметри ооцитів *Xenopus*. Двох-МЕ фіксація потенцалу на ооцитах *Xenopus* та її особливості. Методика "зрізаного ооцита". Метод скляної воронки для внутрішньоклітинної перфузії та фіксації потенциалу ооцитів *Xenopus*. "patch-clamp" в застосуванні до ооцитів.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (1 год.)***

*1. Способи видалення оболонок ооцита.*

*2. Метод макроскопічного "patch-clamp".*

**Змістовий модуль №4: Методи флуоресцентної мікроскопії**

**4.1. Оптичні вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію – 2 год.**

Перші вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Люмінісцентні та флуоресцентні індикатори. Характеристика сучасних флуоресцентних індикаторів кальцію. Методи введення індикаторів в клітину. Формула Гринкевича-Чена для двох хвильового методу вимірювання абсолютної концентрації кальцію.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Індикатори примембранної та органельної концентрациї кальцію.*

*2. Калібрування установки для вимірювання концентрациї кальцію.*

**4.2. Інші флуоресцентні індикатори – 1 год.**

Індикатори потенціалу. Використання зеленого флуорисцентного протеїну та його похідних для візуалізації каналів та рецепторів.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Флуоресцентні маркери мембрани та огранел.*

*2. Поняття про каналородопсин.*

**4.3. Флуоресцентний мікроскоп – 1 год.**

Блок схема флуоресцентного мікроскопа. Блок схема установки для флуоресцентних досліджень динамічних процесів. Суміщення флуорометричних та електрофізіологічних досліджень.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Поняття про TIRF мікроскопію.*

*2. Оптичний "patch clamp".*

**4.4. Принципи конфокальної мікроскопії – 1 год.**

Одно- та двохфотонний конфокальний мікроскопи, переваги та недоліки кожного з них. Дослідження ко-локалізації мембранних білків з використанням резонансного переносу енергії.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Теоретичні основи резонансного переносу енергії.*

*2. Використання антитіл в імунофлуорисцентних дослідженнях.*

**4.5. Методи надшвидкого прикладання розчинів з використанням "caged" біологічно активних речовин – 1 год.**

Методи надшвидкої зміни розчинів в електрофізіологічному експерименті. Поняття про "caged" речовини. Вимоги до "caged" речовин. Способи введення "caged" речовин в клітину.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Типи "caged" речовин.*

*2. Електрофізіологічні експерименти з використанням "caged" речовин.*

**4.6. Вимірювання екзоцитоза та секреції – 1 год.**

Оцінка екзоцитоза по змінам ємності мембрани. Карбонові електроди. Амперометричні вимірювання секреції.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Роль кальцію в секреції.*

*2. Білки, задіяні в екзоцитозі.*

**4.7. Дослідження транспортних процесів в модельних мембранах – 1 год.**

Склад та властивості штучних мембран. Ліпосоми та «плоскі» мембрани. Вбудова мембранних білків в штучні мембрани. Електрофізіологічні вимірювання на плоских мембранах.

***На самостійне опрацювання студентами виносяться проблеми (2 год.)***

*1. Дослідження хлорних каналів та ацетилхолінового рецептора в штучних мембранах.*

*2. Дослідження каналоформуючих токсинів тваринного та бактеріального походження.*

**Практичні заняття (усього 17 год.)**

Практичні методи виготовлення хлорсрібних електродів.

Практичні методи виготовлення індиференнтних електродів.

Практичні методи виготовлення металевих мікроелектродів.

Практичні методи покращення електричних параметрів скляних мікроелектродів.

Операційні підсилювачі та їх характеристики.

Реалізація конкретних схем на основі операційних підсилювачів.

Методи одержання ізольованих клітин.

Практичні методи оцінки швидкодії та просторової однорідності фіксації потенціалу.

Виготовлення пластикових електродів для внутрішньоклітинної перфузії.

Практичні методи виготовлення скляних мікропіпеток для методу "patch clamp".

Методи швидкої аплікації біологічно активних речовин на клітину в електрофізіологічному експерименті.

Ізоляція та інжекція ооцитів шпорцевої жаби *Xenopus laevis*.

Іонселективні мікроелектроди.

**Навчально-методичні матеріали**

**Електрофізіологія в історичному контексті:**

●Verkhratsky A, Krishtal OA, Petersen OH. "From Galvani to patch-clamp: the development of electrophysiology", Pflugers Arch. 453:233-247, 2006. [у вільному доступі]

●Verkhratsky A, Parpura V. "History of electrophysiology and the patch clamp", Methods Mol Biol. 1183:1-19, 2014.

**Електроди:**

●Качалов ЮП, Гнетов АВ, Ноздрачев АД. "Металлический микроэлектрод", Л., Наука, 1980.

●Гнетов АВ, Качалов ЮП, Ноздрачев АД. "Стеклянный микроэлектрод", Л., Наука, 1986.

●Purves RD. “Microelectrode methods for intracellular recording and ionophoresis”, Lond., N.-Y. etc., Academic Press, 1981.

**Операційні підсилювачі:**

●Достал И. "Операционные усилители", Москва, Мир, 1982.

**Біофізика іонних каналів і електрофізіологія в широкому контексті:**

●Збірник методичних статей "Ion channels" в книжковій серії “Methods in Enzymology”, v. 207, Academic Press, 1992.

●Hille В. "Ion channels of excitable membranes", 3rd Edition, Sunderland MA, Sinauer Associates Inc., 2001.

●Костюк ПГ, Зима ВЛ, Магура ІС, Мірошниченко МС, Шуба МФ. “Біофізика”, Київ, Обереги, 2001.

●Ogden DC, editor. "Microelectrode techniques, the Plymouth workshop handbook". 2nd Edition, Cambridge, UK, Company of Biologists, 1994.

**Аналіз мембранних струмів:**

Standen NB, Davies NW, Langton PD. "Separation and analysis of macroscopic currents", 1994. <http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes_ch03.pdf>

**Внутрішньоклітинна перфузія:**

●Костюк ПГ, Крышталь ОА. "Механизмы электрической возбудимости нервной клетки", М., Наука, 1981.

●Kostyuk PG, Krishtal OA. “Intracellular perfusion of excitable cells”, New York. John Wiley & Sons, Ltd., 1984.

**Фіксація потенціалу на багатоклітинних препаратах:**

●Mert T. "Sucrose-gap technique: advantages and limitations" Neirofiziologiya/Neurophysiology, 39(3);270-274, 2007.

**Patch-clamp:**

●Hamill OP, Marty A, Neher B, Sakmann B, Sigworth FJ. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", Pflugers Arch. 391:85-100, 1981.

●Сакман Б, Неер Э. "Регистрация одиночных каналов", Москва, Мир, 1987.

●DeFelice LJ. "Electrical properties of cells. Patch-clamp for biologists", New York and London. Plenum Press, 1997.

●Molleman A. "Patch clamping. An introductory guide to patch-clamp electrophysiology", John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, 2003.

●“The Axon CNS guide to electrophysiology & biophysics laboratory techniques”, <http://student.ulb.ac.be/~dgall/Axon_Guide.pdf> [у вільному доступі]

**Змістовий модуль №3:**

●Б. Хеймс, С. Хиггинс "Транскрипция и трансляция", М., Мир, 1987.

●Шуба ЯМ. "Основи молекулярної фізіології іонних каналів", Київ, Наукова думка, 2010.

Оригінальні журнальні статті та огляди.

Матеріали інтернету