



## МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗБУДЛИВИХ МЕМБРАН

### Робоча програма навчальної дисципліни (Силабус)

#### Реквізити навчальної дисципліни

|                                             |                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Рівень вищої освіти                         | <i>Перший (магістерський)</i>                                                                                                                                                                     |
| Галузь знань                                | <i>10 Природничі науки</i>                                                                                                                                                                        |
| Спеціальність                               | <i>105 Прикладна фізика та наноматеріали</i>                                                                                                                                                      |
| Освітня програма                            | <i>Прикладна фізика</i>                                                                                                                                                                           |
| Статус дисципліни                           | <i>Вибіркова</i>                                                                                                                                                                                  |
| Форма навчання                              | <i>очна(денна)</i>                                                                                                                                                                                |
| Рік підготовки, семестр                     | <i>1 курс, осінній семестр</i>                                                                                                                                                                    |
| Обсяг дисципліни                            | <i>4 кр/120 годин (36 лекційних, 18 практичних, 66 СРС)</i>                                                                                                                                       |
| Семестровий контроль/ контрольні заходи     | <i>Залік, модульна контрольна робота, домашня контрольна робота</i>                                                                                                                               |
| Розклад занять                              | <i>2 год. лекційні на тиждень та 2 год практичних занять раз на 2 тижні</i>                                                                                                                       |
| Мова викладання                             | <i>Українська</i>                                                                                                                                                                                 |
| Інформація про керівника курсу / викладачів | <i>Лектор/Практичні: к.б.н. Пурнинь Олена Едуардівна<br/>ст.н.с. Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України<br/>e-mail: <a href="mailto:purnin.oe@gmail.com">purnin.oe@gmail.com</a></i> |
| Розміщення курсу                            | <i><a href="https://do.ipk.kpi.ua/course/view.php?id=4086">https://do.ipk.kpi.ua/course/view.php?id=4086</a> (Moodle)</i>                                                                         |

#### Програма навчальної дисципліни

##### 1. Опис навчальної дисципліни, її мета, предмет вивчення та результати навчання

Курс «Методи дослідження збудливих мембран» є ключовим для опанування студентами сучасними методологічними підходами і фізичними приладами, що широко застосовуються в експериментальній біофізиці для дослідження транспортної та сигнальної функції клітинних мембран. Він ставить за мету розвиток у студентів навичок постановки електрофізіологічного експерименту, реєстрації біоелектричних явищ, обробки та інтерпретації одержаних результатів. Передбачається вивчення механізмів біоелектрогенезу, принципів збору та аналізу електрофізіологічної інформації на макро та мікрорівнях, підходів до клонування, функціональної експресії та структурно-функціонального аналізу мембранних іонних каналів та рецепторів, а також основ флуорисцентної та конфокальної мікроскопії.

Метою дисципліни «Методи дослідження збудливих мембран» є ознайомлення студентів з теоретичними та експериментальними підходами, які лежать в основі дослідження біоелектричної функції клітинних мембран. Вивчення курсу є необхідним етапом для закладання бази подальшої спеціалізації. Ці знання, уміння та навички контролюються за допомогою контрольних робіт (тестових, модульної та домашньої) і заліку в кінці семестру.

Навчання здійснюється на основі студентоцентрованого підходу та взаємодії викладача та студента, а також колективної роботи студентів під час практичних занять, що сприятиме кращому засвоєнню теоретичного матеріалу та розвитку практичних навичок.

Згідно з вимогами освітньо-наукової програми студенти після засвоєння навчальної дисципліни

мають продемонструвати такі результати навчання:

**знання:**

- механізмів виникнення біоелектрики та властивості біомембран;
- вимог та принципів побудови електрофізіологічної апаратури та установки;
- фізичної хімії поведінки металів та скла в електролітах;
- принципів виготовлення та роботи електродів та мікроелектродів;
- загальних методичних підходів для електрофізіологічного дослідження клітин;
- існуючих експериментальних методик електрофізіологічного дослідження різних типів клітин та багатоклітинних препаратів;
- принципів збору, аналізу та обробки електрофізіологічної інформації на макро та мікрорівнях;
- підходів до клонування, функціональної експресії та структурно-функціонального аналізу мембранних каналів та рецепторів;
- властивостей експресійних систем для функціонального аналізу клонованих каналів та рецепторів;
- використання флуорисцентних зондів для візуалізації та кількісної характеристики внутрішньоклітинних структур, біологічно активних речовин та процесів;
- основи флуорисцентної та конфокальної мікроскопії;

**вміння:**

- орієнтуватися та використовувати сучасний арсенал методичних підходів для дослідження клітинних мембран.,
- оперувати характерними параметрами збудливих мембран,
- користуватись сучасною науковою періодикою з біофізики;

**досвід:**

- знайомства з міждисциплінарним підходом,
- застосування знань, отриманих при вивченні фундаментальних курсів,
- доповідання та представлення результатів індивідуальної роботи.

Набуті знання та практичні навички сформують у студентів наступні компетентності.

Загальні компетентності.

ЗК 1 Здатність до абстрактного мислення, аналізу і синтезу

ЗК 2 Здатність до навчання та самонавчання (пошуку, оброблення та аналізу інформації з різних джерел)

ЗК3 Здатність до вербальної комунікації на фаховому рівні

ЗК 10 Здатність генерувати нові ідеї й нестандартні підходи до їх реалізації (креативність)

ЗК 12 Здатність до здійснення діяльності, безпечної для себе та суспільства

Фахові компетентності.

ФК 1 Здатність виконувати аналіз спеціальної літератури, формулювати постановку наукової або науково-технічної задачі, обирати методи та методики, складати програми наукових досліджень та науково-технічних розробок у галузі прикладної фізики та наноматеріалів.

ФК 2 Здатність до безперервного поглиблення фундаментальних знань та систематичного вивчення та аналізу нової науково-технічної інформації, світового досвіду в галузі прикладної фізики

ФК 3 Здатність застосовувати теоретичні знання для аналізу фізичних систем, явищ і процесів в галузі прикладної фізики та наноматеріалів

ФК 9 Здатність використовувати знання про фізичну природу об'єктів у роботах по створенню нових приладів, апаратури, систем, обладнання, речовин і матеріалів (наноматеріалів)

ФК 10 Здатність до аналізу фізичних принципів функціонування інформаційних процесів у фізичних системах, в т.ч. в енергетиці та біофізиці

ФК 11 Здатність до вибору методів дослідження структури, складу та властивостей матеріалів (наноматеріалів), що використовуються або застосовуються в фізичних,

біофізичних та енергетичних системах, вибору оптимальних параметрів дослідження і розуміння границь застосування обраного методу

ФК 12 Здатність готувати об'єкти дослідження та вибирати необхідне лабораторне устаткування для досліджень властивостей явищ і процесів у фізичній, біофізичній системі, в області фізики живих систем

## 2. Пререквізити та постреквізити дисципліни (місце в структурно-логічній схемі навчання за відповідною освітньою програмою)

Для засвоєння матеріалу курсу студенти повинні мати знання в рамках базових курсів загальної фізики, вищої математики та біофізики, а також знати основи клітинної біології та фізичної хімії.

Міждисциплінарні зв'язки:

навчальна дисципліна «Методи дослідження збудливих мембран» входить до циклу професійної підготовки (вибіркові освітні компоненти);

дисципліни, що передують: Основи загальної біології та біохімії, Основи біофізики.

Отримані практичні навички та засвоєні теоретичні знання під час вивчення навчальної дисципліни «Методи дослідження збудливих мембран» можна використовувати в подальшому під час вивчення всіх навчальних дисциплін, особливо у дисциплінах, пов'язаних з біологічними системами, а саме: «біофізика мембранних структур», «біохімія клітинних процесів», «молекулярна фізіологія», «біофізика синаптичної передачі» та написання магістерської дисертації за відповідно вибраною траєкторією.

## 3. Зміст навчальної дисципліни

### Структура кредитного модуля

| Назви розділів і тем                                                    | Кількість годин |              |                         |                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------|-------------------------|---------------------------------------|-----------|
|                                                                         | Всього          | у тому числі |                         |                                       |           |
|                                                                         |                 | Лекції       | Практичні (семінарські) | Лабораторні (комп'ютерні й практикум) | СРС       |
| 1                                                                       | 2               | 3            | 4                       | 5                                     | 6         |
| <b>Розділ 1. Основи біоелектрогенезу та методи електрофізіології</b>    |                 |              |                         |                                       |           |
| <b>Тема 1. Теоретичні основи біоелектрогенезу.</b>                      | 2               | 4            | -                       | -                                     | -         |
| <b>Тема 2. Методи електрофізіології.</b>                                | 8               | 20           | 2                       | -                                     | 4         |
| <i>Разом за розділом 1</i>                                              | 40              | 24           | 8                       | -                                     | 18        |
| <b>Розділ 2. Молекулярні процеси органів та систем</b>                  |                 |              |                         |                                       |           |
| <b>Тема 3. Методи дослідження рекомбінантних каналів та рецепторів.</b> | 6               | 4            | -                       |                                       | 4         |
| <b>Тема 4. Методи флюоресцентної мікроскопії.</b>                       | 6               | 8            | -                       |                                       | 4         |
| <i>Модульна контрольна робота</i>                                       | 4               |              | 2                       | -                                     | 2         |
| <i>Домашня контрольна робота</i>                                        | 12              |              | 0                       | -                                     | 12        |
| <i>Разом за розділом 2</i>                                              | 80              | 12           | 10                      | -                                     | 48        |
| <i>Залік</i>                                                            |                 |              |                         |                                       |           |
| <b>Всього годин</b>                                                     | <b>120</b>      | <b>36</b>    | <b>18</b>               | <b>-</b>                              | <b>66</b> |

## 4. Навчальні матеріали та ресурси

### Рекомендована література

#### Базова

1. Шуба ЯМ. "Основи молекулярної фізіології іонних каналів", Київ, Наукова думка, 2010.
2. Костюк ПГ, Зима ВЛ, Магура ІС, Мірошніченко МС, Шуба МФ. "Біофізика", Київ, Обереги, 2001.
3. Verkhratsky A, Pappas V. "History of electrophysiology and the patch clamp", *Methods Mol Biol.* 1183:1-19, 2014.
4. Качалов ЮП, Гнетов АВ, Ноздрачев АД. "Металлический микроэлектрод", Л., Наука, 1980.
5. Костюк ПГ, Крышталъ ОА. "Механизмы электрической возбудимости нервной клетки", М., Наука, 1981.
6. Гнетов АВ, Качалов ЮП, Ноздрачев АД. "Стеклоанный микроэлектрод", Л., Наука, 1986.
7. Сакман Б, Неер Э. "Регистрация одиночных каналов", Москва, Мир, 1987.

### Додаткова/Інтернет ресурси

Для повторення та/або поглибленого розгляду питань, пов'язаних з клітинною біологією, фізичною хімією, біофізикою тощо можна використовувати відповідні навчальні посібники.

1. B. Alberts, A. D. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts and P. Walter. *Molecular biology of the cell*/6<sup>th</sup> ed. W.W.Norton&Co, 2014.
2. П.Г. Костюк, В.Л. Зима, І.С. Магура, М.С. Мірошніченко, М.Ф. Шуба. *Біофізика/ К. «Київський університет»*, 2008.
3. *Фізіологія з основами анатомії людини / За ред. Л.М. Малоштан. — Х.: НФаУ: Золоті сторінки, 2003. — 432 с*
4. Verkhratsky A, Krishtal OA, Petersen OH. "From Galvani to patch-clamp: the development of electrophysiology",
5. *Pflugers Arch.* 453:233-247, 2006. [у вільному доступі]Purves RD. "Microelectrode methods for intracellular recording and iontophoresis", Lond., N.-Y. etc., Academic Press, 1981.
6. Достал И. "Операционные усилители", Москва, Мир, 1982.
7. Збірник методичних статей "Ion channels" в книжковій серії "Methods in Enzymology", v. 207, Academic Press, 1992.
8. Hille B. "Ion channels of excitable membranes", 3rd Edition, Sunderland MA, Sinauer Associates Inc., 2001.
9. Ogden DC, editor. "Microelectrode techniques, the Plymouth workshop handbook". 2nd Edition, Cambridge, UK, Company of Biologists, 1994.
10. Standen NB, Davies NW, Langton PD. "Separation and analysis of macroscopic currents", 1994. [http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes\\_ch03.pdf](http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes_ch03.pdf)
11. Kostyuk PG, Krishtal OA. "Intracellular perfusion of excitable cells", New York. John Wiley & Sons, Ltd., 1984.
12. Mert T. "Sucrose-gap technique: advantages and limitations" *Neirofiziologiya/Neurophysiology*, 39(3);270-274, 2007.
13. 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. DeFelice LJ. "Electrical properties of cells. Patch-clamp for biologists", New York and London. Plenum Press, 1997.
14. Molleman A. "Patch clamping. An introductory guide to patch-clamp electrophysiology", John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, 2003.
15. "The Axon CNS guide to electrophysiology & biophysics laboratory techniques", [http://student.ulb.ac.be/~dgall/Axon\\_Guide.pdf](http://student.ulb.ac.be/~dgall/Axon_Guide.pdf) [у вільному доступі]
16. Б. Хеймс, С. Хиггинс "Транскрипция и трансляция", М., Мир, 1987.

Оригінальні журнальні статті та огляди.

Для знайомства з сучасним станом моделювання в біофізиці, поглибленого розгляду окремих питань та при виконанні домашньої контрольної роботи рекомендується ресурс PubMed

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> - база даних, що включає резюме та повні тексти наукових робіт за медико-біологічною тематикою.

## Навчальний контент

### 5. Методика опанування навчальної дисципліни (освітнього компонента)

#### Лекційні заняття

| Назва теми лекції та перелік основних питань |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| № з/п                                        | <b>Тема 1. Теоретичні основи біоелектрогенезу</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Лекція 1</b>                              | <b>1.1. Із історії біоелектрики.</b><br>Досліди Гальвані. Перші вимірювання потенціалу пошкодження, струмів спокою та струмів дії. Розвиток методів вимірювання біопотенціалів. Теорії виникнення біоелектричних явищ.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Лекція 2.</b>                             | <b>1.2. Мембранна теорія.</b><br>Етапи становлення та розвитку мембранної теорії біоелектрогенезу. Структура, функція та властивості біомембран. Подтримання 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. Механізми селективності іонних каналів.                                                                                                                                                                    |
|                                              | <b>Тема 2. Методи електрофізіології</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Лекція 3</b>                              | <b>2.1. Металеві електроди.</b><br>Фізхімія металів в електролитах. Металеві електроди, їх призначення та електрохімічні властивості. Зворотні електроди. Поляризація електродів. Рухливість іонів в електролітах. Соляні містки та дифузійні потенціали. Індиферентний електрод та способи його виготовлення.                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Лекція 4</b>                              | <b>2.2. Внутрішньоклітинні вимірювання електричних потенціалів.</b><br>Металеві мікроелектроди (МЕ): області їх вживання та недоліки. Виготовлення металічних 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. Природа виникнення потенціалу кінчика скляного МЕ. Типи вольт-амперних характеристик скляних МЕ. Заповнення скляних МЕ. Механічне та термічне загострення скляних МЭ. Багатоканальні скляні МЕ. Утримувач МЕ |
| <b>Лекція 5</b>                              | <b>2.3. Методи вимірювання біоелектричних сигналів.</b><br>Основні вимірювальні схеми. Апаратура та прилади, які застосовуються в сучасних електрофізіологічних дослідженнях. Загальна блок схема електрофізіологічної установки. Блок схема електрофізіологічного підсилювача. Попередні підсилювачі, їх призначення та основні вимоги.                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                              | <b>2.4. Операційні підсилювачі (ОП) та їх параметри.</b><br>Ідеальний ОП. Зворотній зв'язок в схемах на ОП. Основні схеми включення ОП та їх аналіз. Стабільність схем на ОП. Шумові властивості ОП.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Лекція 6</b>                              | <b>2.5. Метод фіксації струму.</b><br>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.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                              | <b>2.6. Метод фіксації потенціалу.</b><br>Критерії адекватності фіксації потенціалу. Просторова та часова фіксація. Поняття послідовного опору при фіксації потенціалу. Одно- та двух-МЕ фіксація. Електронні схеми фіксації потенціалу. Области застосування фіксації                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |



|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | <p>потенціалу.</p> <p><b>2.7. Обробка даних, одержуваних методом фіксації потенціалу.</b><br/>Способи розділення загального трансмембранного іонного струму на компоненти. Вольт-амперні характеристики (ВАХ) мембрани, миттєві ВАХ, струми протікання. Аналітичний опис ВАХ. Поняття про активацію, деактивацію та інактивацію струмів та відповідних їм каналів. Часова та стаціонарна активація та інактивація струмів, способи їх вимірювання та опису. Експериментальні протоколи, які застосовуються для визначення різних характеристик струмів. Вороні струми. Комерційна програма pCLAMP для збору та обробки електрофізіологічних даних.</p> |
| <b>Лекція 7</b>  | <p><b>2.8. Фіксація потенціалу на багатоклітинних препаратах.</b><br/>Тканини які утворюють клітинний синцитій. Щільові контакти. Поодинокі та подвійний сахарозний місток. Практичні обмеження та недоліки методів сахарозного містка. Способи врахування та пониження похибок методів сахарозного містка.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                  | <p><b>2.9. Фіксація мембранного потенціалу на ізольованих клітинах.</b><br/>Фіксація мембранного потенціалу за допомогою двох внутріклітинних мікроелектродів. Фіксація мембранного потенціалу за допомогою одного внутріклітинного мікроелектроду. Переваги та недоліки кожного з методів фіксації потенціалу. Порівняння електронних схем одно- та двохмікроелектродної фіксації.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Лекція 8</b>  | <p><b>2.10. Метод внутрішньоклітинної перфузії.</b><br/>Поєднання методів фіксації потенціалу та внутрішньоклітинної перфузії. Ряд сприятливих внутрішньоклітинних аніонів. Внутрішньоклітинна перфузія на основі пластикових знарядь (мікропіпеток). Виготовлення пластикових знарядь. Послідовний опір. Модифікації методу внутрішньоклітинної перфузії. Аналіз шумів з метою визначення характеристик поодиноких каналів. Переваги та недоліки методу фіксації потенціалу в умовах внутріклітинної перфузії.</p>                                                                                                                                    |
| <b>Лекція 9</b>  | <p><b>2.11. Метод "patch clamp".</b><br/>Мікроелектроди 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 внутріклітинного діалізу в конфігурації "whole cell". Поняття про "перфорований" "patch clamp".</p>                                                                                                                                                                  |
|                  | <p><b>2.12. Особливості електронної схеми методу "patch clamp".</b><br/>Претворювач струм-напруга, як основний елемент попереднього підсилювача. Вимоги до опору зворотнього зв'язку. Корекція полоси пропускання електронної схеми. Компенсація швидких та повільних перехідних процесів. Компенсація послідовного опору. Комерційно доступні підсилювачі "patch clamp", їх переваги та недоліки.</p>                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                  | <p><b>2.13. Реєстрація активності поодиноких каналів.</b><br/>Поняття про шуми та способи їх оцінки. Джерела шуму в методі "patch clamp" та шляхи підвищення його чутливості.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Лекція 10</b> | <p><b>2.14. Комп'ютерна обробка даних по активності поодиноких каналів.</b><br/>Пороговий детектор подій. Вплив полоси пропускання та частоти відцифровки на детекцію подій. Одержання часових та амплитудних характеристик поодиноких каналів. Пачечна активність. Відповідність характеристик макроскопічних струмів та поодиноких каналів. Створення кінетичної схеми роботи каналу по даним його елементарної активності. Комерційна програма для збору та обробки даних по активності поодиноких каналів - pCLAMP.</p>                                                                                                                            |
|                  | <b>Тема 3. Методи дослідження рекомбінантних каналів та рецепторів</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Лекція 11</b> | <p><b>3.1. Молекулярно біологічні підходи до дослідження іонних каналів та</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  | <p><b>рецепторів.</b><br/>Генетичний код та його зв'язок з первинною структурою білка. Біохімічне виділення мембранних білків. Способи клонування іонних каналів та рецепторів. Бібліотеки геномної та комплементарної ДНК. Вектори ДНК.</p>                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                  | <p><b>3.2. Попередній аналіз клонованих каналів та рецепторів.</b><br/>Виведення первинної структури клонованого каналу. Гидропатичний профіль та його зв'язок з топологією мембранного білка. Ідентифікація транс- и та позамембранних ділянок. Змійчасті діаграми. Дендрограми гомологічних каналів. Природа різноманіття однотипних каналів: гомологічні гени, альтернативний сплайсинг та редагування мРНК.</p>                                                                                      |
|                  | <p><b>3.3. Структурно-функціональний аналіз клонованих каналів та рецепторів.</b><br/>Основні родини клонованих каналів та рецепторів. Основні та службові субодиниці каналів. Гомо- та гетеромультимерні канали. Ідентифікація функціонально важливих ділянок. Внесення мутацій та функціональна експресія клонованих каналів та рецепторів.</p>                                                                                                                                                        |
| <b>Лекція 12</b> | <p><b>3.4. Характеристика систем для функціональної експресії екзогенних каналів та рецепторів.</b><br/>Іморталізовані клітинні лінії, їх одержання та культивування. Ооцити шпорцевої жаби <i>Xenopus laevis</i>, їх морфологія, процедура виділення та утримування.</p>                                                                                                                                                                                                                                |
|                  | <p><b>3.5. Методи введення генетичного матеріалу в експресійні системи.</b><br/>Способи трансфекції екзогенної ДНК в клітинні лінії. Маркери трансфекції. Транзйентна та стабільна трансфекція. Інжекція сумарної мРНК, виділеної з різних тканин, та комплементарної мРНК клонованих каналів в ооцити <i>Xenopus</i>.</p>                                                                                                                                                                               |
|                  | <p><b>3.6. Електрофізіологічні методи дослідження експресованих каналів та рецепторів.</b><br/>"Patch clamp". Електричні параметри ооцитів <i>Xenopus</i>. Двох-МЕ фіксація потенціалу на ооцитах <i>Xenopus</i> та її особливості. Методика "зрізаного ооцита". Метод скляної воронки для внутрішньоклітинної перфузії та фіксації потенціалу ооцитів <i>Xenopus</i>. Метод макроскопічного "patch clamp". Комерційна установка для одночасного електрофізіологічного дослідження багатьох ооцитів.</p> |
|                  | <b>Тема 4. Методи флуорисцентної мікроскопії</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Лекція 13</b> | <p><b>4.1. Оптичні вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію.</b><br/>Перші вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Люмінесцентні та флуорисцентні індикатори. Характеристика сучасних флуорисцентних індикаторів кальцію. Методи введення індикаторів в клітину. Формула Гринкевича-Чена для двоухвильового методу вимірювання абсолютної концентрації кальцію. Індикатори примембранної та органельної концентрації кальцію.</p>                                              |
|                  | <p><b>4.2. Інші флуорисцентні індикатори.</b><br/>Індикатори потенціалу. Використання зеленого флуорисцентного протеїну та його похідних для візуалізації каналів та рецепторів.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Лекція 14</b> | <p><b>4.3. Флуорисцентний мікроскоп.</b><br/>Блок схема флуорисцентного мікроскопа. Блок схема установки для флуорисцентних досліджень динамічних процесів. Суміщення флуориметричних та електрофізіологічних досліджень.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Лекція 15</b> | <p><b>4.4. Принципи конфокальної мікроскопії.</b><br/>Одно- та двофотонний конфокальний мікроскопи, переваги та недоліки кожного з них. Дослідження ко-локалізації мембранних білків з використанням резонансного переносу енергії.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                  | <p><b>4.5. Методи надшвидкого прикладання розчинів з використанням "caged" біологічно активних речовин.</b><br/>Методи надшвидкої зміни розчинів. Поняття про "caged" речовини. Вимоги до "caged" речовин. Способи введення "caged" речовин в клітину. Типи "caged" речовин. Електрофізіологічні експерименти з використанням "caged" речовин.</p>                                                                                                                                                       |
| <b>Лекція 16</b> | <b>4.6. Вимірювання екзоцитоза та секретії.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Оцінка екзоцитоза по змінам ємності мембрани. Карбонові електроди. Амперометричні вимірювання секреції.                                                                                                                                         |
|  | <b>4.7. Дослідження транспортних процесів в модельних мембранах.</b><br>Склад та властивості штучних мембран. Ліпосоми та «плоскі» мембрани. Вбудова мембранних білків в штучні мембрани. Електрофізіологічні вимірювання на плоских мембранах. |

### *Практичні заняття*

| <i>№ з/п</i> | <i>Назва теми практичного заняття та перелік основних питань.</i>                                                                                                           |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.           | Експерименти Карло Маттеучі.<br>Дифузійна теорія В.Ю. Чаговця виникнення демаркаційного потенціалу.                                                                         |
| 2.           | Розвиток уявлень про іонну вибірковість мембран та іонні канали.<br>Селективність натрієвих, калієвих і кальцієвих каналів.                                                 |
| 3.           | Сфери використання металевих електродів у біології і медицині. Природа виникнення потенціалу кінчика скляного МЕ. Кузня Фонбрюна для виготовлення скляних мікроінструментів |
| 4.           | Основні електрофізіологічні схеми на базі ОП.                                                                                                                               |
| 5.           | Експериментальні протоколи, які застосовуються для визначення біофізичних характеристик мембранних струмів.                                                                 |
| 6.           | Роль кальцію в секреції. Білки, задіяні в екзоцитозі. Окиснювально-відновні реакції секретованих речовин на поверхні карбонових електродів.                                 |
| 7.           | Природа різноманіття однотипних каналів: гомологічні гени, альтернативний сплайсинг та редагування мРНК.<br>Основні класи та родини іонних каналів                          |
| 8.           | Індикатори примембранної та органельної концентрації кальцію. Калібрування установки для вимірювання концентрації кальцію.                                                  |
| 9.           | Типи "caged" речовин.. Електрофізіологічні експерименти з використанням "caged" речовин.                                                                                    |

### **6. Самостійна робота студента/аспіранта**

Самостійна робота студентів включає вивчення теоретичного матеріалу, підготовку до аудиторних занять, підготовку доповідей за темами практичних занять, знайомство з науковою періодикою, виконання домашньої контрольної роботи, підготовку до модульної контрольної роботи.

### **Політика та контроль**

#### **7. Політика навчальної дисципліни (освітнього компонента)**

Зазначається система вимог, які викладач ставить перед студентом/аспірантом.

- Відвідування лекцій (та відсутність на них) не оцінюється. Однак, студентам рекомендується відвідувати заняття, оскільки на них викладається теоретичний матеріал та розвиваються навички, необхідні для виконання контрольних робіт та успішного складання заліку.
- У системі оцінювання значною є питома вага балів за активність студента на заняттях.
- Під час занять необхідно дотримуватись звичних правил поведінки. На заняттях не передбачається пошук інформації в мережі Інтернет, відповідно, мобільні телефони рекомендується відключати.
- Індивідуальні завдання (міні-довіді, задачі) доповідаються під час практичних занять, після доповіді виділяється час на питання та обговорення. Відповіді на запитання впливають на сумарну оцінку доповіді.



- Заохочувальні та штрафні бали не передбачені, проте додаткові бали можуть бути зараховані за доповіді на заняттях за результатами виконання індивідуальних завдань.
- Терміни виконання контрольних робіт оголошуються перед їх початком, робота, не представлена вчасно, не зараховується.
- Політика та принципи академічної доброчесності визначені у розділі 3 Кодексу честі Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (<https://kpi.ua/code>).

## 8. Види контролю та рейтингова система оцінювання результатів навчання (PCO)

### Поточний контроль.

| № | Контрольний захід                                                                       | Бали                       |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| 1 | Активність на лекційних заняттях<br>(відповіді на запитання, участь в обговоренні тощо) | 1-2 бали, максимально 25   |
| 2 | Відповіді та вирішення завдань на практичних заняттях                                   | 1-3 бали, максимально 25   |
| 3 | Доповіді на заняттях                                                                    | Додаткові бали, максимум 5 |
| 4 | Модульна контрольна робота                                                              | максимум 25                |
| 5 | Домашня контрольна робота                                                               | максимум 25                |
|   | <b>Разом</b>                                                                            | <b>100</b>                 |

### Календарний контроль.

| Контрольний захід         |                  | Перша атестація. | Друга атестація. |
|---------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Термін атестації          |                  | 8 тиждень        | 16 тиждень.      |
| Умови отримання атестації | Поточний рейтинг | ≥10 балів        | ≥30 балів        |
|                           |                  |                  | +                |
|                           |                  |                  | +                |

### Семестровий контроль: залік

Умови допуску до семестрового контролю: виконані модульна та домашня контрольні роботи, семестровий рейтинг більше 60 балів.

Таблиця відповідності рейтингових балів оцінкам за університетською шкалою:

| Кількість балів           | Оцінка       |
|---------------------------|--------------|
| 100-95                    | Відмінно     |
| 94-85                     | Дуже добре   |
| 84-75                     | Добре        |
| 74-65                     | Задовільно   |
| 64-60                     | Достатньо    |
| Менше 60                  | Незадовільно |
| Не виконані умови допуску | Не допущено  |

## 9. Додаткова інформація з дисципліни (освітнього компонента)

### • Теми модульної контрольної роботи (приклади).

1. Хлорсрібний електрод, електрохімічні реакції, які на ньому відбуваються..
2. Механізм виникнення ПД.
3. Застосування антибіотиків для “перфорації” мембрани.
4. Способи покращення електричних параметрів мікропіпеток.
5. Структурні ознаки потенціалкерованих каналів.

### • Теми домашньої контрольної роботи (приклади).

1. Операційні підсилювачі (ОП) та їх параметри.

2. *Конексини, їх структура і функція.*
3. *Природа виникнення потенціалу кінчика скляного мікроелектрода*
4. *Конфігурації методу "patch clamp"*
5. *Основні характеристики та переваги методу "patch clamp"*

**Робочу програму навчальної дисципліни (силабус):**

**Складено** ст. викл., к.б.н. **Пурнинь Олена Едуардівна**

**Ухвалено** кафедрою прикладної фізики (протокол № 6 від 11.06.2024)

**Погоджено** методичною комісією НН ФТІ (протокол № 6 від 27.06.2024)