

# НАВЧАЛЬНО-ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН ДИСЦИПЛІНИ

## "Основи електрофізіологічного експерименту"

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 потенціалу 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. Механізми селективності іонних каналів.

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

1. Реотом Ю. Бернштейна, вимірювання швидкості розповсюдження ПД.
2. Ліпоїдна теорія мембран Ч. Овертона.
3. Розвиток уявлень про іонну вибірковість мембран та іонні канали.
4. Досліди Б. Хіллі.
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 електролітах. 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 їх 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. Области 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. Вольтамперні 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 активація та інактивація струмів, способи їх вимірювання 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 багатоклітинного препарату.

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

Поєднання методів фіксації потенціалу та внутрішньоклітинної перфузії. Ряд сприятливих внутрішньоклітинних аніонів. Внутрішньоклітинна перфузія на основі пластикових

мікропіпеток. Виготовлення пластикових мікропіпеток. 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.**

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 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 зв'язку. 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. Комп'ютерна обробка даних по активності поодиноких каналів – 1 год.**

Пороговий детектор подій. Вплив полоси пропускання та частоти оцифровки на детекцію подій. Одержання часових та амплітудних 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. Комерційна програма для збору та обробки даних по активності поодиноких каналів – pCLAMP.

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

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

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.

**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 каналу. Профіль гідропатичності та його зв'язок з топологією мембранного білка. Ідентифікація транс- та позамембранних ділянок. Змішчасті діаграми. Дендрограми гомологічних каналів.

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

1. Природа різноманіття однотипних каналів: гомологічні гени, альтернативний сплайсинг, редагування мРНК.
2. Метод заміненних цистеїнів.

### **3.3. Структурно-функціональний 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 функціональної експресії екзогенних 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 матеріалу в експресійні системи – 2 год.**

Способи трансфекції екзогенної ДНК в клітинні лінії. Маркери трансфекції. Транз'єнтна 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. Електрофізіологічні методи дослідження експресованих каналів та рецепторів – 1 год.**

Електричні параметри ооцитів *Xenopus*. Двох-МЕ фіксація потенціалу на ооцитах *Xenopus* та її особливості. Методика "зрізаного ооцита". Метод скляної воронки для внутрішньоклітинної перфузії та фіксації потенціалу 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 концентрації кальцію.

2. Калібрування установки для вимірювання концентрації кальцію.

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

Індикатори потенціалу. Використання зеленого флуоресцентного 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 двофотонний 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 імунофлуоресцентних 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 індиферентних 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.

## Рекомендовані 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, Pappas 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. "Стеклоанный микроэлектрод", Л., Наука, 1986.
- Purves RD. "Microelectrode methods for intracellular recording and iontophoresis", 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 B. "Ion channels of excitable membranes", 3rd Edition, Sunderland MA, Sinauer Associates Inc., 2001.
- Костюк ПГ, Зима ВЛ, Магура ІС, Мірошніченко 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](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" Neurofiziologiya/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](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

## Контрольні питання обов'язкові для знання

1. Інструменти, які використовуються для внутрішньоклітинного відведення електричних сигналів від ізольованих клітин, їх характеристика.
2. Характеристики і властивості хлор-срібного електрода.
3. Природа виникнення дифузійних потенціалів, їх мінімізація і врахування при електрофізіологічних вимірюваннях.
4. Теорія постійного поля і рівняння Голдмана-Ходжкіна-Каца.
5. Метод фіксації струму.
6. Метод фіксації потенціалу.
7. Поняття послідовного опору (опору доступу) та його вплив на якість відведення струмів в методі фіксації потенціалу.
8. Еквівалентна електрична схема клітини та її модифікації при підключенні до вимірювальних схем.
9. Поняття про "віконний" струм та природа його виникнення.
10. Поняття про "хвостовий" струм та природа його виникнення.
11. Фіксація потенціалу на багатоклітинних препаратах.
12. Двохмікроелектродна фіксація потенціалу: призначення, переваги, недоліки.
13. Електричні параметри скляного мікроелектрода, їх оптимізація та вплив на відведення внутрішньоклітинних електричних сигналів.
14. Кількісний опис потенціалзалежності стаціонарної активації та інактивації іонних струмів.
15. Дослідження концентраційної залежності дії фармакологічних речовин на іонні струми та її кількісний опис.
16. Вимоги до внутрішньоклітинних електродів в методі "patch-clamp".
17. Особливості та переваги методу "patch-clamp" в порівнянні з іншими електрофізіологічними методами.
18. Джерела шуму в методі "patch-clamp" та шляхи підвищення його роздільної здатності.
19. Характеристика конфігурацій методу "patch-clamp" для реєстрації активності поодиноких каналів.
20. "Whole-cell" конфігурація методу "patch-clamp", її призначення та ефективність.
21. Аналіз топології каналоутворюючих мембранних білків.
22. Клітинні системи для функціональної експресії клонуваних каналів та рецепторів.
23. Принцип побудови та функціонування конфокального мікроскопа.
24. Рашиометричні (ratiometric) флуоресцентні індикатори кальцію, формула Грінкевича-Чена (Grynkiewicz-Tsien).
25. Поняття про "caged" речовини та їх використання в електрофізіологічному експерименті.



## Теми рефератів...

- 1) **Іонні основи підтримання потенціалу спокою та генерації потенціалу дії**, основні типи трансмембранних іонних струмів, які в цьому задіяні та класифікація відповідних Na-, Ca-, K-каналів.
- 2) **Фіксація потенціалу**, еквівалентна електрична схема клітини, послідовний опір, одно- і двохелектродна фіксація, швидкість фіксації, проблеми просторової фіксації.
- 3) **Аналіз вольт-амперних характеристик макроскопічних трансмембранних іонних струмів**, криві потенціалзалежності стаціонарної активації та інактивації та їх аналітичний опис, рівняння Больцмана та ГХК, поняття про хвостовий (tail current) та віконний (window current) струми.
- 4) **Дослідження дії фармакологічних речовин на іонні струми**, отримання концентраційних залежностей дії, різниця між ізотермою Ленгмюра та рівнянням Хіла, оцінка потенціалзалежності дії.
- 5) **Методи внутрішньоклітинного діалізу та перфузії**, як попередники "patch-clamp", їх конкретні реалізації та способи зменшення струму втрат.
- 6) **Метод "patch-clamp" – його принципи, переваги та основні конфігурації**.
- 7) **Калієва провідність клітин: основні типи калієвих каналів та їх функціональне значення**.
- 8) **Вимірювання електричних сигналів на багатоклітинних препаратах**, тканини, що утворюють електричний синцитій, метод сахарозного містка (sucrose gap method).
- 9) **Принцип аналізу поодиноких іонних каналів**, пороговий детектор подій, гістограми розподілу амплітуд, та часу життя каналу в різних станах.
- 10) **Принципи флуоресцентної та лазерної конфокальної мікроскопії**.
- 11) **Раціонаметричні (ratiometric) та не-раціонаметричні (non-ratiometric) флуоресцентні барвники для оцінки внутрішньоклітинної концентрації кальцію**, формула Гринкевича-Чена.
- 12) **Поняття про saged-речовини: особливості структури та області застосування**.
- 13) **Каналродопсин (channelrhodopsin, ChR1-2) та оптогенетика**.
- 14) **Механочутливість клітин ссавців, механочутливі канали з родини PIEZO**.
- 15) **Кальцій-активовані хлорні канали та їх представник anoctamin 1 (ANO1, альтернативне позначення TMEM16A)**.

- 16) Регуляція клітинного об'єму, та участь у ньому об'ємчутливого хлорного leucine-rich repeats-containing 8A (LRRC8A) каналу (альтернативне позначення SWELL1).
- 17) Автоматизація електрофізіологічних досліджень – high-throughput electrophysiology: принципи, призначення, досягнення.
- 18) Способи вимірювання секреторної активності клітин: амперометрія, флуктуації ємності мембрани.