

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
"Казанский (Приволжский) федеральный университет"
Институт фундаментальной медицины и биологии



подписано электронно-цифровой подписью

Программа дисциплины

Теория апоптоза, аутофагии и некроза

Направление подготовки: 06.04.01 - Биология

Профиль подготовки: Медико-биологические науки

Квалификация выпускника: магистр

Форма обучения: очное

Язык обучения: русский

Год начала обучения по образовательной программе: 2016

Содержание

1. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю), соотнесенных с планируемыми результатами освоения ОПОП ВО
2. Место дисциплины (модуля) в структуре ОПОП ВО
3. Объем дисциплины (модуля) в зачетных единицах с указанием количества часов, выделенных на контактную работу обучающихся с преподавателем (по видам учебных занятий) и на самостоятельную работу обучающихся
4. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов и видов учебных занятий
 - 4.1. Структура и тематический план контактной и самостоятельной работы по дисциплине (модулю)
 - 4.2. Содержание дисциплины (модуля)
5. Перечень учебно-методического обеспечения для самостоятельной работы обучающихся по дисциплине (модулю)
6. Фонд оценочных средств по дисциплине (модулю)
7. Перечень литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)
8. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети "Интернет", необходимых для освоения дисциплины (модуля)
9. Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины (модуля)
10. Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень программного обеспечения и информационных справочных систем (при необходимости)
11. Описание материально-технической базы, необходимой для осуществления образовательного процесса по дисциплине (модулю)
12. Средства адаптации преподавания дисциплины (модуля) к потребностям обучающихся инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья
13. Приложение №1. Фонд оценочных средств
14. Приложение №2. Перечень литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)
15. Приложение №3. Перечень информационных технологий, используемых для освоения дисциплины (модуля), включая перечень программного обеспечения и информационных справочных систем

Программу дисциплины разработал(а)(и) профессор, д.н. (профессор) Абрамова З.И. (кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии, Центр биологии и педагогического образования), Zinaida.Abramova@kpfu.ru

1. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю), соотнесенных с планируемыми результатами освоения ОПОП ВО

Обучающийся, освоивший дисциплину (модуль), должен обладать следующими компетенциями:

Шифр компетенции	Расшифровка приобретаемой компетенции
ОПК-1	готовность к коммуникации в устной и письменной формах на русском и иностранном языках для решения задач профессиональной деятельности
ОПК-4	способность самостоятельно анализировать имеющуюся информацию, выявлять фундаментальные проблемы, ставить задачу и выполнять полевые, лабораторные биологические исследования при решении конкретных задач с использованием современной аппаратуры и вычислительных средств, нести ответственность за качество работ и научную достоверность результатов
ОПК-7	готовность творчески применять современные компьютерные технологии при сборе, хранении, обработке, анализе и передаче биологической информации для решения профессиональных задач
ПК-1	способность творчески использовать в научной и производственно-технологической деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов дисциплин (модулей), определяющих направленность (профиль) программы магистратуры
ПК-2	способность планировать и реализовывать профессиональные мероприятия

Обучающийся, освоивший дисциплину (модуль):

Должен знать:

- Об особенностях путей программируемой клеточной гибели (ПКГ);
- ОБ молекулярно-клеточных механизмах некроза и апоптоза;
- О молекулярных механизмах ПКГ, его роли в развитии патологий (канцерогенеза и аутоиммунных заболеваний);
- О биологической роли ПКГ;
- О физико-химических методах исследования биомолекул участвующих при запуске ПКГ

Программируемая гибель клеток (апоптоз, аутофагия, некроз) - генетически контролируемый и эволюционно консервативный процесс, необходимый и отвечающий за гомеостаз организма. Нарушения в регуляции гибели клеток играют важную роль в патогенезе различных заболеваний. Прямая связь ПКГ и многих патологических состояний сегодня уже не вызывает сомнения.

Исследования нарушения функции многих генов, регулирующих ПКГ, позволят разрабатывать совершенно новые направления в терапии этих заболеваний. Например, при злокачественных опухолях и лимфопролиферативных заболеваниях требуется усилить апоптоз, а при заболеваниях, характеризующихся поражением клеток, необходимо ослабить его. С другой стороны, регуляция аутофагии-является тем фактором, который может превратить злокачественные опухолевые клетки в онкоцитомы-клетки доброкачественной опухоли. Таким образом, исследования механизмов апоптоза и других форм клеточной гибели являются одним из важнейших направлений современной биологии и медицины.

Целью дисциплины 'Теория апоптоза, аутофагии и некроза' является: подготовка специалистов в области исследования механизмов клеточной гибели.

Задачи:

- Показать разнообразие предполагаемых типов ПКГ у животных, растений и прокариот
- Изложить накопленные данные о механизмах инициации и реализации ПКГ.
- Раскрыть значение нарушения ПКГ в регуляции гибели клеток и патогенезе ряда заболеваний

Должен уметь:

- Распознавать основные макро- и микроскопические признаки различных форм ПКС;

- Определять отличительные морфологические признаки апоптоза, аутофагии и некроза на светооптическом, ультраструктурном и биохимическом уровнях;
- Использовать знания о формах гибели клеток для выяснения функционального назначения апоптоза и аутофагии в жизнедеятельности организма;
- Использовать методы изучения процессов апоптоза и аутофагии в исследовательской практике;
- Работать на проточном цитометре.

Должен владеть:

- теоретическими основами методологии изучения программированной клеточной гибели
- базовыми профессионально-профилированными методами получения лабораторной биологической информации
- обладать теоретическими знаниями об особенностях апоптотических процессов в клетке, знать различные способы детекции апоптоза и аутофагии;
- навыками выделения клеток, ДНК из клеток, уметь работать с изучаемыми объектами;
- представлять основные этапы работы с клетками для изучения апоптоза и аутофагии

Должен демонстрировать способность и готовность:

самостоятельно анализировать имеющуюся информацию, выявлять фундаментальные проблемы, ставить задачу и выполнять лабораторные биологические исследования при решении конкретных задач по специализации с использованием современной аппаратуры и вычислительных средств, демонстрировать ответственность за качество работ и научную достоверность результатов.

2. Место дисциплины (модуля) в структуре ОПОП ВО

Данная дисциплина (модуль) включена в раздел "Б1.В.ОД.7 Дисциплины (модули)" основной профессиональной образовательной программы 06.04.01 "Биология (Медико-биологические науки)" и относится к обязательным дисциплинам.

Осваивается на 1 курсе в 2 семестре.

3. Объем дисциплины (модуля) в зачетных единицах с указанием количества часов, выделенных на контактную работу обучающихся с преподавателем (по видам учебных занятий) и на самостоятельную работу обучающихся

Общая трудоемкость дисциплины составляет 3 зачетных(ые) единиц(ы) на 108 часа(ов).

Контактная работа - 30 часа(ов), в том числе лекции - 0 часа(ов), практические занятия - 0 часа(ов), лабораторные работы - 30 часа(ов), контроль самостоятельной работы - 0 часа(ов).

Самостоятельная работа - 42 часа(ов).

Контроль (зачёт / экзамен) - 36 часа(ов).

Форма промежуточного контроля дисциплины: экзамен во 2 семестре.

4. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов и видов учебных занятий

4.1 Структура и тематический план контактной и самостоятельной работы по дисциплине (модулю)

N	Разделы дисциплины / модуля	Семестр	Виды и часы контактной работы, их трудоемкость (в часах)			Самостоятельная работа
			Лекции	Практические занятия	Лабораторные работы	
1.	Тема 1. АПОПТОЗ. КОНЦЕПЦИЯ ГИБЕЛИ КЛЕТОК -Морфологические признаки апоптоза.	2	0	0	2	5
2.	Тема 2. АУТОФАГИЯ. ПРИНЦИП КЛЕТОЧНОЙ АУТОФАГИИ -Морфологические признаки аутофагии.	2	0	0	4	5
3.	Тема 3. НЕКРОПТОЗ /НЕКРОЗ -Особенности морфологии некроптоза/ некроза.	2	0	0	4	5

N	Разделы дисциплины / модуля	Семестр	Виды и часы контактной работы, их трудоемкость (в часах)			Самостоятельная работа
			Лекции	Практические занятия	Лабораторные работы	
4.	Тема 4. Получение образцов клеток для анализа. Выделение и очистка ДНК. Общие принципы работы с ДНК. Критерий чистоты препаратов ДНК. Лабораторные методы выделения ДНК. Метод экстракции смесью фенол/хлороформ, высокосолевого метод, выделение ДНК с использованием коммерческого набора	2	0	0	4	5
5.	Тема 5. Оценка структурно-функциональных изменений плазмалеммы при апоптозе: Оценка асимметричности распределения фосфатидилсеринов в ПМ с помощью Annexin V	2	0	0	4	5
6.	Тема 6. Оценка связанных с апоптозом изменений клеточного ядра. Горизонтальный электрофорез ДНК в агарозном геле. Приготовление агарозного геля, определение концентрации выделенной ДНК, нанесение образцов на гель, оценка результатов апоптоза клеток с детекцией фрагментированной ДНК в агарозном геле	2	0	0	4	6
7.	Тема 7. Анализ выживаемости клеток, метод Tunnel. Стерильный забор клеток из культуральных плашек, окрашивание флуоресцентными красителями и визуализация клеток методом проточной цитометрией.	2	0	0	4	6
8.	Тема 8. Анализ индукции аутофагии методом блоттинга	2	0	0	4	5
	Итого		0	0	30	42

4.2 Содержание дисциплины (модуля)

Тема 1. АПОПТОЗ. КОНЦЕПЦИЯ ГИБЕЛИ КЛЕТОК -Морфологические признаки апоптоза.

АПОПТОЗ.

КОНЦЕПЦИЯ ГИБЕЛИ КЛЕТОК

Роль гибели клеток *in vivo*. Классификация типов клеточной гибели. Морфология апоптоза и некроза. Воспаление - неотъемлемая характеристика патологического некроза, связанная с отсутствием фагоцитоза. Роль клеточной гибели в развитии организма. Филогенез гибели клеток. Стадии клеточной гибели. Основные пути гибели клеток: внешний и митохондриальный. Основные семейства белков, участвующих в регуляции гибели клеток. Различия в чувствительности клеток к гибели и времени ее развития. Основные клеточные компартменты принимающие участие в гибели клеток. Дефицит или ускоренная гибель клеток и последствия приводящие к развитию болезней, ассоциированных с гибелью клеток.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

Патогенез апоптоза.

- Патогенетический рецепторный путь апоптоза
- Митохондриальный механизм апоптоза.
- Регуляторы апоптоза.
- Гены, участвующие в индукции апоптоза.

-Морфологические признаки апоптоза.

Роль апоптоза в развитии болезней:

-Снижение апоптоза.

-Ускорение апоптоза.

Значение апоптоза в развитии организма и патологических процессах

Атипичные типы гибели клетки:

-Митотическая катастрофа

-Анойкис

-Ороговение или кератинизация

-Валлеровская дегенерация.

-Экзитотоксичность.

-Параптоз

Тема 2. АУТОФАГИЯ. ПРИНЦИП КЛЕТОЧНОЙ АУТОФАГИИ -Морфологические признаки аутофагии.

АУТОФАГИЯ

Виды аутофагии. Стадии аутофагии. Образование фагофора, ULK1/ULK2 комплекс, роль протеинкиназы mTORC1, роль белка Bif1. Регуляторная роль комплексов PtdIns3K и белка Beclin-1. Конъюгация Atg5-Atg12, процессинг LC3 и встраивание в мембрану LC3B-II, замыкание мембраны и образование аутофагосом. Слияние аутофагосом с лизосомами с образованием аутолизосом. Позитивная и негативная регуляция аутофагии посредством опухолевого супрессора p53. Роль белков семейства Bcl2. Причинно-следственные связи между аутофагией и клеточной смертью. Критерии клеточной смерти от аутофагии. Взаимная регуляция аутофагии и апоптоза.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ:

ПРИНЦИП КЛЕТОЧНОЙ АУТОФАГИИ

-Этология.

-Патогенез аутофагии.

-Ультраструктура аутофагосом и аутофаголизосом

-Молекулярный механизм аутофагии

-Морфологические признаки аутофагии.

Роль аутофагии в развитии болезней

Тема 3. НЕКРОПТОЗ /НЕКРОЗ -Особенности морфологии некроптоза/ некроза.

НЕКРОПТОЗ /НЕКРОЗ

Три основных типа клеточной гибели: апоптоз, некроптоз/некроз, аутофагия. Различия в морфологии этих трех типов клеточной гибели и особенности морфологии некроптоза/ некроза. История открытия некроптоза как типа программируемой клеточной гибели. Понятие некроптоза как программируемой клеточной гибели и некроза как спонтанного типа смерти. Основные участники некроптоза киназы rip1/rip3. Их доменная организация, их модификации. Nec1 как ингибитор киназы rip1 и некроптоза. Комплексы некросома/Рипоптосома. Основные молекулы входящие в состав комплекса: rip1/rip3, fadd, Caspase-8, c-Flip. Деубиквитилирование белка rip1 и фосфорилирование белков rip1/rip3 как основа для индукции некроптоза.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

-Этиологические факторы, вызывающие некроз

-Этиологические виды некроза

-Патогенез некроза

-Стадии морфогенеза некроза

-Микроскопические признаки некроза

Роль некроза в развитии болезней

Тема 4. Получение образцов клеток для анализа. Выделение и очистка ДНК. Общие принципы работы с ДНК. Критерий чистоты препаратов ДНК. Лабораторные методы выделения ДНК. Метод экстракции смесью фенол/хлороформ, высокосолевого метод, выделение ДНК с использованием коммерческого набора

ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Оборудование:

Центрифуга типа Eppendorf 5815;

Центрифуга типа Eppendorf 5810R

Биомагнитный сепаратор клеток

Микроскоп Primover T

Выделение лимфоцитов на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho=1,077$)

Цель работы: получение лимфоцитов из крови

Принцип разделения клеток крови в градиенте плотности основан на различиях в величине их плавучей плотности.

При центрифугировании в градиентном растворе клетки крови перемещаются в пробирке до тех пор, пока не достигнут области градиента, где их плавучая плотность равна плотности среды.

Плотность градиента для фракционирования форменных элементов крови человека и животных различна. Для разделения лимфоидных клеток человека используют градиент плотности, равный 1,077 г/см³, а лимфоцитов мыши ? 1,119 г/см³. При этом плавучая плотность мононуклеаров и лимфоцитов меньше, чем таковая величина используемого градиента, поэтому данные клетки располагаются над градиентом. Гранулоциты и эритроциты, имеющие большую плавучую плотность, в процессе седиментации проходят через градиентный раствор и опускаются на дно пробирки.

В качестве градиента плотности для разделения клеток крови можно использовать коммерческий препарат фиколл-400 (?Sigma-Aldrich? Швеция) или смесь фиколла с рентгеноконтрастными веществами с высокой плотностью (урографин, верографин, уротраст или изопак).

Фиколл - это фирменное название синтетического высокомолекулярного сополимера сахарозы и эпихлоргидрина. В иммунологических исследованиях используют 6,1%-или 9%-ные растворы фиколла с молекулярной массой 400 кДа (Фиколл 400). Для приготовления раствора фиколла его растворяют в теплой дистиллированной воде.

Протокол:

Выделение лимфоцитов из крови доноров проводят с помощью метода седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (A. Voym, 1974)*.

-В центрифужную пробирку на 3 мл раствора фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл) наложить 3 мл разведенной крови.

-Центрифугировать в течение 45 мин при 3000 об / мин.

В результате центрифугирования кровь разделяется на 4 отдельные фракции: -первая фракция на дне пробирки содержит эритроциты и обломки клеток крови.

-Вторая фракция ? это раствор фиколл-урографина.

-Третья фракция, расположенная над градиентом, представляет собой суспензию лимфоидных клеток.

-Четвертая фракция образована плазмой с тромбоцитами.

Слой лимфоцитов осторожно собрать по всей площади сечения пробирки, перенести в чистую, сухую центрифужную пробирку и разбавить ФСБ в соотношении 1:1.

Содержимое пробирки центрифугировать 5 мин при 3000 об / мин.

Затем надосадочную жидкость удалить, а полученный осадок ресуспендировать в ФСБ, доводя его концентрацию до 2×10^6 клеток/мл с помощью камеры Горяева

Тема 5. Оценка структурно-функциональных изменений плазмалеммы при апоптозе: Оценка асимметричности распределения фосфатидилсеринов в ПМ с помощью Annexin V

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ В КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЕ

Изменение клеточной мембраны проводят окрашиванием лимфоцитов с помощью флуорохрома мероцианина 540 (MC540), специфически связывающихся с молекулами фосфатидилсерина (ФС). Регистрация клеток с повышенной интенсивностью флуоресценции выявляет экспрессию ФС, что позволяет идентифицировать апоптотические клетки

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ: Образцы клеток (приблизительная оптимальная концентрация образца

$2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ клеток/мл)

Индуктирующий агент ? дексаметазон. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Флуоресцентный краситель (например, пропидий йодид, Alexa Fluor 488 ? аннексин V). Дистиллированная вода; Стерильные пробирки типа Falcon и для проточного цитометра; Стерильные наконечники; Центрифуга типа Eppendorf 5804; Проточный цитометр BD FACSCalibur.

ПРОТОКОЛ:

1. Индуцировать апоптоз в клетках использованием вышеописанного метода. Подготовить отрицательный контроль путем инкубации клеток в отсутствие индуцирующего агента.

2. Отмыть клетки после инкубационного периода в холодном фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

3. Подготовить 1X аннексин-буфер для связывания. Например, для ~ 10 анализов, добавить к 1 мл 5X аннексин-связывающего буфера 4 мл деионизированной воды.

4. Подготовить 100 мкг / мл рабочего раствора PI путем разбавления 5 мкл 1 мг / мл исходного раствора PI в 45 мкл 1X аннексин-связывающего буфера. Сохранить неиспользованную часть этого рабочего раствора для будущих экспериментов.

5. Центрифугировать клетки для промывки (с шагом 2), отбросить супернатант и ресуспендировать клетки в 1X аннексин-буфере для связывания. Подсчитать количество клеток и развести в 1X аннексин-связывающем буфере до ~ 1×10^6 клеток / мл, развести в достаточном объеме, чтобы иметь 100 мкл на анализ.

6. Добавить 5 мкл Alexa Fluor ? 488 аннексина V (компонент) и 1 мкл рабочего раствора PI (100 мкг / мл) (подготовленный на шаге 4) на каждые 100 мкл суспензии клеток
7. Инкубировать клетки при комнатной температуре в течение 15 минут.
8. По окончании инкубационного периода, добавить 400 мкл 1X аннексин-связывающего буфера, аккуратно перемешать и держать образцы на льду.
9. Как можно скорее провести анализ окрашенных клеток методом проточной цитометрии, измерение флуоресценции при 530 нм (например, FL1) и > 575 нм (например, FL3).

Популяция клеток должна разделиться на три группы:

- живые клетки показывают только низкий уровень флуоресценции,
- апоптотические клетки показывают зеленую флуоресценцию, и
- мертвые клетки показывают красную и зеленую флуоресценцию

Тема 6. Оценка связанных с апоптозом изменений клеточного ядра. Горизонтальный электрофорез ДНК в агарозном геле. Приготовление агарозного геля, определение концентрации выделенной ДНК, нанесение образцов на гель, оценка результатов апоптоза клеток с детекцией фрагментированной ДНК в агарозном геле

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В 1%-НОМ АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Метод позволяет разделить макромолекулы, различающиеся по размерам, пространственной конфигурации и вторичной структуре. В ходе работы мы использовали 1% агарозный гель.

Приготовление 1%-ного раствора агарозы

Растворить 1г в 100мл буфера для электрофореза (45мМ трис-ОН, 1,25мМ Na₂-ЭДТА, 4,5мМ борная кислота).

Взвесь нагревать в бане с кипящей водой до тех пор, пока агароза не растворится и варится 2 часа. Перед работой раствор выдерживается при температуре 50°C.

ПРОТОКОЛ

1. Перед проведением электрофореза все детали прибора для электрофореза протирали этанолом: стекло, на которое наносится расплавленный гель, пластмассовые бортики (ограничители поля для электрофореза), гребенка, при помощи которой штампуются лунки в геле. Пластмассовые бортики закрепляли на стекле, щели заливали агарозой. Для этого пипеткой наносили вдоль бортиков небольшое количество агарозы. Когда расплав затвердел, в форму выливали раствор агарозы (40 мл) и сразу вставили гребенку (на расстоянии 1 см от одного из концов геля), от зубцов которой в геле остаются лунки для проб. Необходимо, чтобы между дном лунки и основанием геля оставался слой агарозы, толщиной 0,1 мм.

2. Когда гель полностью затвердел (через 30-45 мин при комнатной температуре), осторожно убрали бортики и гребенку. Добавили электродный буфер, содержащий 2мкг/мл бромистого этидия, так, чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1мм.

3. Пробы ДНК (10-1мкл) смешивали с 2 мкл бромфенолового синего и вносили в лунки геля под буфер. Электрофорез вели в горизонтальном направлении на пластинах размером 10×11×3 мм при напряжении 5 В/см, в течение 3,5 часов при 20°C.

4. После окончания электрофореза гель окрашивали (если бромистый этидий не присутствует в буфере для электрофореза) в течение 40 мин раствором бромистого этидия в концентрации 2 мкг/мл и фотографировали в УФ-свете (видеосистема для регистрации гелей ?DNA Analyzer?)

Тема 7. Анализ выживаемости клеток, метод Tunnel. Стерильный забор клеток из культуральных плашек, окрашивание флуоресцентными красителями и визуализация клеток методом проточной цитометрией.

TUNEL-метод

Множественные разрывы ДНК, возникающие в процессе апоптоза, можно детектировать, пометив образующиеся при этом свободные концы нитей ДНК. Именно этот принцип лежит в основе метода TUNEL (от англ. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP Nick End Labeling).

Для проведения этого анализа клетки предварительно фиксируют и пермеабелизируют. При последующем инкубировании их в растворе, содержащем экзогенную терминальную дезоксирибонуклеотидил трансферазу и молекулы Br-dUTP, происходит ферментативное присоединение меченных дезоксиридинтрифосфатов к свободным концам молекул ДНК.

Встраивание Br-dUTP идентифицируется с помощью FITC-конъюгированных анти-Br-dUTP моноклональных антител. В апоптотических клетках из-за образования множественных разрывов в ДНК количество связавшегося флуорофора значительно превышает таковое для нормальных клеток. Различия в уровне флуоресценции, регистрируемые на проточном цитофлуориметре, позволяют разделить пул живых и гибнущих клеток в тестируемом образце. При использовании данного метода за-

трудно различие апоптотических и некротических клеток, поскольку в обоих случаях имеет место деградация ядерной ДНК. В качестве вспомогательных параметров могут учитываться значения прямого и бокового светорассеяния, а также количества внутриклеточной ДНК, выявляемой путем дополнительного окрашивания клеток красителем PI.

Тема 8. Анализ индукции аутофагии методом блоттинга

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АУТОФАГОСОМ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.

Суспензию лимфоцитов фиксировать 2,5% раствором глutarового альдегида (Serva, Германия) на фосфатном буфере (pH 7,2) и 1% раствором OsO₄ (Serva, Германия) на том же буфере.

Образцы дегидратировали в этаноле восходящей концентрации, ацетоне и окиси пропилена (Serva, Германия).

Материал заливать эпоксидной смолой Эпон 812 (Serva, Германия).

Полимеризовали образцы в течение трёх суток в термостате при температуре 37, 45 и 60°C, соответственно.

Срезы готовят на ультрамикротоме LKB-III (Швеция),

контрастировать насыщенным водным раствором уранилацетата (Serva, Германия) и раствором цитрата свинца.

Препараты фотографировать на электронном микроскопе Hitachi-125 (Япония). ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ LC3В БЕЛКА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ.

Визуализацию аутофагосом проводить после 3 сут. культивирования с применением антител, меченых FITC против белка LC3В (LC3В Antibody Kit for Autophagy, Molecular Probes) на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss AxioScore A1 (оснащенном видеокамерой AxioCam MRc5).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ LC3В БЕЛКА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ.

Экспрессию LC3В белка определяем на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson) с применением первичных моноклональных антител (LC3В rabbit monoclonal antibody, Invitrogen, Molecular Probes) и вторичных меченых FITC антител (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, Molecular Probes).

Детекцию флуоресценции проводят в FL1 канале.

В каждом образце было собрано и проанализировано 10 тыс. событий.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЛИЗОСОМ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ. Визуализацию лизосом проводят окрашиванием клеток после 3 сут. культивирования акридиновым оранжевым (ПанЭко, Россия), приготовленным на буфере Макильвейна. Лизосомы живых клеток флуоресцируют оранжевым цветом.

5. Перечень учебно-методического обеспечения для самостоятельной работы обучающихся по дисциплине (модулю)

Самостоятельная работа обучающихся выполняется по заданию и при методическом руководстве преподавателя, но без его непосредственного участия. Самостоятельная работа подразделяется на самостоятельную работу на аудиторных занятиях и на внеаудиторную самостоятельную работу. Самостоятельная работа обучающихся включает как полностью самостоятельное освоение отдельных тем (разделов) дисциплины, так и проработку тем (разделов), осваиваемых во время аудиторной работы. Во время самостоятельной работы обучающиеся читают и конспектируют учебную, научную и справочную литературу, выполняют задания, направленные на закрепление знаний и отработку умений и навыков, готовятся к текущему и промежуточному контролю по дисциплине.

Организация самостоятельной работы обучающихся регламентируется нормативными документами, учебно-методической литературой и электронными образовательными ресурсами, включая:

Порядок организации и осуществления образовательной деятельности по образовательным программам высшего образования - программам бакалавриата, программам специалитета, программам магистратуры (утвержден приказом Министерства образования и науки Российской Федерации от 5 апреля 2017 года №301)

Письмо Министерства образования Российской Федерации №14-55-996ин/15 от 27 ноября 2002 г. "Об активизации самостоятельной работы студентов высших учебных заведений"

Устав федерального государственного автономного образовательного учреждения "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Правила внутреннего распорядка федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Локальные нормативные акты Казанского (Приволжского) федерального университета

Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide -

http://medicine.yale.edu/labmed/cellsorter/start/Introduction_66019_284_10028.pdf

Комплексный подход при оценке программируемой гибели (апоптоза) клеток человека -

https://www.researchgate.net/profile/Vasily_Grinev/publication/262493893_System_approach_in_assessment_of_programmed

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ -

<http://studygur.ru/doc/1092852/metody-issledovaniya-programmiruemoj-kletochnoj-gibeli>

Проточная цитофлуориметрия - http://www.unn.ru/books/met_files/flow_cytometry.pdf

учебное пособие проточная цитометрия -

<https://books.google.ru/books?id=UD54x-p8lvkC&pg=PA722&lpg=PA722&dq=%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%B1%D0%BD>

6. Фонд оценочных средств по дисциплине (модулю)

Фонд оценочных средств по дисциплине (модулю) включает оценочные материалы, направленные на проверку освоения компетенций, в том числе знаний, умений и навыков. Фонд оценочных средств включает оценочные средства текущего контроля и оценочные средства промежуточной аттестации.

В фонде оценочных средств содержится следующая информация:

- соответствие компетенций планируемым результатам обучения по дисциплине (модулю);
- критерии оценивания сформированности компетенций;
- механизм формирования оценки по дисциплине (модулю);
- описание порядка применения и процедуры оценивания для каждого оценочного средства;
- критерии оценивания для каждого оценочного средства;
- содержание оценочных средств, включая требования, предъявляемые к действиям обучающихся, демонстрируемым результатам, задания различных типов.

Фонд оценочных средств по дисциплине находится в Приложении 1 к программе дисциплины (модулю).

7. Перечень литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

Освоение дисциплины (модуля) предполагает изучение основной и дополнительной учебной литературы.

Литература может быть доступна обучающимся в одном из двух вариантов (либо в обоих из них):

- в электронном виде - через электронные библиотечные системы на основании заключенных КФУ договоров с правообладателями;
- в печатном виде - в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского. Обучающиеся получают учебную литературу на абонементе по читательским билетам в соответствии с правилами пользования Научной библиотекой.

Электронные издания доступны дистанционно из любой точки при введении обучающимся своего логина и пароля от личного кабинета в системе "Электронный университет". При использовании печатных изданий библиотечный фонд должен быть укомплектован ими из расчета не менее 0,5 экземпляра (для обучающихся по ФГОС 3++ - не менее 0,25 экземпляра) каждого из изданий основной литературы и не менее 0,25 экземпляра дополнительной литературы на каждого обучающегося из числа лиц, одновременно осваивающих данную дисциплину.

Перечень основной и дополнительной учебной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля), находится в Приложении 2 к рабочей программе дисциплины. Он подлежит обновлению при изменении условий договоров КФУ с правообладателями электронных изданий и при изменении комплектования фондов Научной библиотеки КФУ.

8. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети "Интернет", необходимых для освоения дисциплины (модуля)

КЛЕТОЧНАЯ ТЕОРИЯ МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ - <http://biology-of-cell.narod.ru/subject2.html>

mol-biol.ru - <http://mol-biol.ru/o-sayte.html>

Аутофагия, протофагия и остальные - <http://biomolecula.ru/content/1192>

Клетка - <http://www.cellbiol.ru/book/kletka/apoptoz>

Клеточная гибель - <http://biology-of-cell.narod.ru/cell-dividing27.html>

Методы - <http://molbiol.ru/protocol/>

Методы проточной цитометрии - <http://researchpark.spbu.ru/methods-biomed-rus/1912-bio-metod-06-rus>

Программируемая гибель клеток в медицине Борис Животовский -

http://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/432413/Programmiruemaya_gibel_kletok_meditisine

Проточная цитометрия - http://www.ckpgene.ru/left/protochnaya_citometriya/

9. Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины (модуля)

Методические указания к выполнению лабораторных работ

Клеточные культуры являются одним из основных инструментов, используемых в клеточной и молекулярной биологии, обеспечивая превосходную модельную систему для изучения нормальной физиологии и биохимии клетки (например, метаболические исследования, старение), воздействие наркотиков и токсических веществ на клетки, мутагенез и канцерогенез. Клеточная культура также используется в скрининге и разработке лекарственных средств, и производстве биологических соединений в больших масштабах (например, вакцин, терапевтических белков). Основное преимущество использования клеточных культур для любого из этих приложений является согласованность и воспроизводимость результатов, которые могут быть получены при использовании клеток

Целью лабораторных работ по дисциплине 'Теория апоптоза, аутофагии и некроза' является приобретение студентами навыков самостоятельного выполнения экспериментальных исследований и анализа результатов по клеточной гибели

Каждая лабораторная/практическая работа требует предварительного изучения теоретического материала. Основные сведения и порядок выполнения работ изложены в пособии: Методы исследования программируемой клеточной гибели: Учебно-методическое пособие для магистров по курсу 'Теория апоптоза'/ Рекомендовано УМО РАЕ по классическому университетскому и техническому образованию в качестве учебника для студентов ВУЗов, обучающихся по направлению подготовки: 020200.68-'Биология' (Магистратура)/Ю. В. Скибо, З.И. Абрамова.-Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011.-56с.

При выполнении лабораторного эксперимента обязательно соблюдение правил техники безопасности! Перед выполнением лабораторных работ студенты должны пройти 'Инструктаж по технике безопасности' и расписаться в соответствующем журнале. Только после этого студент может быть допущен к проведению эксперимента.

В ходе выполнения лабораторных работ студенты внимательно наблюдают за ходом реакций, проводят измерения и записывают наблюдения в рабочий журнал.

После выполнения лабораторной работы студент оформляет отчет. Отчет выполняется отдельно по каждой лабораторной работе. В отчете должны быть следующие разделы:

1. Цель выполнения работы
2. Теоретический раздел
3. Ход работы
4. Выводы

Выполнив лабораторный практикум, студент должен уметь изложить ход выполнения опытов, объяснить результаты работы и выводы из них и подписать отчет у преподавателя.

ИНСТРУКЦИЯ ПО РАБОТЕ С КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК

- Лабораторный халат, перчатки и ботинки нужно носить только в лаборатории культуры клеток
- Тягу в ламинарном боксе необходимо включить по крайней мере за 15 минут, прежде чем начать работать в нем.
- Время использования УФ-лампы составляет 15-30 мин.
- Протрите бокс тщательно 70% этанолом.
- Протрите все, что вы положили в ламинарный бокс 70% этанолом, а также, если Вы использовали водяную баню для согрева жидкостей.
- Протрите руки этанолом, даже если вы носите перчатки. Если вы оставили лабораторию культуры клеток и вернулись, вы должны надеть новые перчатки.
- Если вы капните какой-либо жидкостью (например, среда или PBS) внутри ламинарного бокса или CO₂-инкубатора, очистите его немедленно с этанолом. Обратите внимание, если у вас капнет кровь, очистите ее сначала водой, а затем этанолом
- Все возможные инфекционные твердые отходы, например, кровь должны быть выброшены в отходы контейнера ГМО II, все твердые отходы культуры клеток в контейнер для отходов ГМО I. Все жидкие отходы в 5 л канистры. Обратите внимание, что вы не должны заполнять контейнеры для отходов слишком сильно, закройте его должным образом и принесите новую коробку с полиэтиленовым пакетом. Если пробирки, бутылки и т.д. не содержат клеточных материалов, выбросьте их в обычные отходы.
- После окончания работы очистите поверхность 70% этанолом. Уберите все лишние вещи прочь, ламинарный бокс не место хранения!
- Если вы заметили контаминацию в бутылках для культуры клеток, сообщите всем, кто использует их.
- Обратите особое внимание на требование для стерильных пипеток. Не пипетируйте непосредственно в стерильный бутылке со средой, а отберите аликвоту, например, в 50 мл пробирку.

Расположение предметов в ламинарном боксе

Расположение элементов в ламинарном боксе для культуры клеток обычно придерживается следующих правил, которые могут быть изменены, чтобы включить дополнительные элементы, используемые в конкретных приложениях.

Широкое, чистое свободное пространство с рабочими принадлежностями для культуры клеток в центре. Дозаторов располагается спереди в правой части, где его можно легко достать.

Реагенты и среды в задней части справа, что позволяет легко перемешивать.

Подставка для пробирок для дополнительных реагентов располагается посередине сзади.

Контейнер для жидких отходов слева позади.

Методические рекомендации для семинарских занятий

Тема 1: Апоптоз. Биологическая роль апоптоза.

Цель: изучение общих представлений об апоптозе, пусковых факторов апоптоза, механизма апоптоза, ферментов апоптоза.

Задачи обучения: изучение механизмов апоптоза изнутри и извне.

Основные вопросы:

1. Апоптоз-как запрограммированная клеточная смерть.
2. 'Апоптоз изнутри': пусковые факторы и биологическая роль.
3. 'Апоптоз по команде': биологическая роль и пусковые факторы.
4. Основные ферменты апоптоза.
5. Цитоплазматические протеазы - каспазы.
6. Эндонуклеазы, их роль в апоптозе.
7. Каковы отличия апоптоза и некроза.

Виды контроля:

1. Контроль исходного уровня знаний
2. Разбор результатов самостоятельной работы студентов
3. Контроль итогового уровня знаний

Методы обучения и преподавания:

Семинар и практические занятия:

Тематический семинар: разбор и обсуждение темы занятий, тестирование, глубокое знакомство и обсуждение проблемы по изучаемой теме.

Работа в малых группах (ТБЛ): вначале проводится 'Оценочный тест индивидуальной готовности', тестовый контроль на понимание материала, оценочный тест групповой готовности, обсуждение результатов, определение доли участия каждой группы в процессе работы команды, проведение итогов занятия по ТБЛ.

Информационный блок:

Этапы проведения занятия.

1. Раздать 'оценочный тест индивидуальной готовности' (ОТИГ) (каждому студенту одинаковые тесты).
2. Разделить группу студентов на 2 команды и раздать в каждой группе 'оценочный тест групповой готовности' (ОТГГ).
3. Оценка результатов тестов для выявления уровня подготовленности (ОТИГ+ОТГГ).
4. Выбор председателя и секретаря в каждой команде.
5. Разбор вопросов предложенных студентами с участием преподавателя (мини-лекции или короткая дискуссия).
6. Подведение итогов проведенного занятия и оценка участия каждого студента индивидуально и в команде.
7. Мониторинг процесса обучения команды.

10. Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень программного обеспечения и информационных справочных систем (при необходимости)

Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень программного обеспечения и информационных справочных систем, представлен в Приложении 3 к рабочей программе дисциплины (модуля).

11. Описание материально-технической базы, необходимой для осуществления образовательного процесса по дисциплине (модулю)

Материально-техническое обеспечение образовательного процесса по дисциплине (модулю) включает в себя следующие компоненты:

Помещения для самостоятельной работы обучающихся, укомплектованные специализированной мебелью (столы и стулья) и оснащенные компьютерной техникой с возможностью подключения к сети "Интернет" и обеспечением доступа в электронную информационно-образовательную среду КФУ.

Учебные аудитории для контактной работы с преподавателем, укомплектованные специализированной мебелью (столы и стулья).

Компьютер и принтер для распечатки раздаточных материалов.

Мультимедийная аудитория.
Специализированная лаборатория.
Специализированная лаборатория.
Специализированная лаборатория.

12. Средства адаптации преподавания дисциплины к потребностям обучающихся инвалидов и лиц с ограниченными возможностями здоровья

При необходимости в образовательном процессе применяются следующие методы и технологии, облегчающие восприятие информации обучающимися инвалидами и лицами с ограниченными возможностями здоровья:

- создание текстовой версии любого нетекстового контента для его возможного преобразования в альтернативные формы, удобные для различных пользователей;
- создание контента, который можно представить в различных видах без потери данных или структуры, предусмотреть возможность масштабирования текста и изображений без потери качества, предусмотреть доступность управления контентом с клавиатуры;
- создание возможностей для обучающихся воспринимать одну и ту же информацию из разных источников - например, так, чтобы лица с нарушениями слуха получали информацию визуально, с нарушениями зрения - аудиально;
- применение программных средств, обеспечивающих возможность освоения навыков и умений, формируемых дисциплиной, за счёт альтернативных способов, в том числе виртуальных лабораторий и симуляционных технологий;
- применение дистанционных образовательных технологий для передачи информации, организации различных форм интерактивной контактной работы обучающегося с преподавателем, в том числе вебинаров, которые могут быть использованы для проведения виртуальных лекций с возможностью взаимодействия всех участников дистанционного обучения, проведения семинаров, выступления с докладами и защиты выполненных работ, проведения тренингов, организации коллективной работы;
- применение дистанционных образовательных технологий для организации форм текущего и промежуточного контроля;
- увеличение продолжительности сдачи обучающимся инвалидом или лицом с ограниченными возможностями здоровья форм промежуточной аттестации по отношению к установленной продолжительности их сдачи:
- продолжительности сдачи зачёта или экзамена, проводимого в письменной форме, - не более чем на 90 минут;
- продолжительности подготовки обучающегося к ответу на зачёте или экзамене, проводимом в устной форме, - не более чем на 20 минут;
- продолжительности выступления обучающегося при защите курсовой работы - не более чем на 15 минут.

Программа составлена в соответствии с требованиями ФГОС ВО и учебным планом по направлению 06.04.01 "Биология" и магистерской программе "Медико-биологические науки".

Приложение 2
к рабочей программе дисциплины (модуля)
Б1.В.ОД.7 Теория апоптоза, аутофагии и некроза

Перечень литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

Направление подготовки: 06.04.01 - Биология

Профиль подготовки: Медико-биологические науки

Квалификация выпускника: магистр

Форма обучения: очное

Язык обучения: русский

Год начала обучения по образовательной программе: 2016

Основная литература:

Патологическая анатомия. В 2 т. Т. 1. Общая патология [Электронный ресурс] : учебник / Под ред. В.С. Паукова - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970432525.html>

'Патологическая анатомия : учебник [Электронный ресурс] : учебник / А. И. Струков, В. В. Серов; под ред. В. С. Паукова. - 6-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015.' - <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970432600.html>

Биология. Руководство к лабораторным занятиям [Электронный ресурс] : учеб. пособие / под ред. Н.В. Чебышева. - 2-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970434116.html>

Патофизиология. В 2 т. Т. 1 [Электронный ресурс] : учебник / П.Ф. Литвицкий. - 5-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970431788.html>

Дополнительная литература:

Пособие по клинической биохимии [Электронный ресурс] : учебное пособие / Никулин Б.А. / Под ред. Л.В. Акуленко - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. - <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970403587.html>

Приложение 3
к рабочей программе дисциплины (модуля)
Б1.В.ОД.7 Теория апоптоза, аутофагии и некроза

Перечень информационных технологий, используемых для освоения дисциплины (модуля), включая перечень программного обеспечения и информационных справочных систем

Направление подготовки: 06.04.01 - Биология

Профиль подготовки: Медико-биологические науки

Квалификация выпускника: магистр

Форма обучения: очное

Язык обучения: русский

Год начала обучения по образовательной программе: 2016

Освоение дисциплины (модуля) предполагает использование следующего программного обеспечения и информационно-справочных систем:

Операционная система Microsoft Windows 7 Профессиональная или Windows XP (Volume License)

Пакет офисного программного обеспечения Microsoft Office 365 или Microsoft Office Professional plus 2010

Браузер Mozilla Firefox

Браузер Google Chrome

Adobe Reader XI или Adobe Acrobat Reader DC

Kaspersky Endpoint Security для Windows

Учебно-методическая литература для данной дисциплины имеется в наличии в электронно-библиотечной системе "ZNANIUM.COM", доступ к которой предоставлен обучающимся. ЭБС "ZNANIUM.COM" содержит произведения крупнейших российских учёных, руководителей государственных органов, преподавателей ведущих вузов страны, высококвалифицированных специалистов в различных сферах бизнеса. Фонд библиотеки сформирован с учетом всех изменений образовательных стандартов и включает учебники, учебные пособия, учебно-методические комплексы, монографии, авторефераты, диссертации, энциклопедии, словари и справочники, законодательно-нормативные документы, специальные периодические издания и издания, выпускаемые издательствами вузов. В настоящее время ЭБС ZNANIUM.COM соответствует всем требованиям федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования (ФГОС ВО) нового поколения.

Учебно-методическая литература для данной дисциплины имеется в наличии в электронно-библиотечной системе Издательства "Лань", доступ к которой предоставлен обучающимся. ЭБС Издательства "Лань" включает в себя электронные версии книг издательства "Лань" и других ведущих издательств учебной литературы, а также электронные версии периодических изданий по естественным, техническим и гуманитарным наукам. ЭБС Издательства "Лань" обеспечивает доступ к научной, учебной литературе и научным периодическим изданиям по максимальному количеству профильных направлений с соблюдением всех авторских и смежных прав.

Учебно-методическая литература для данной дисциплины имеется в наличии в электронно-библиотечной системе "Консультант студента", доступ к которой предоставлен обучающимся. Многопрофильный образовательный ресурс "Консультант студента" является электронной библиотечной системой (ЭБС), предоставляющей доступ через сеть Интернет к учебной литературе и дополнительным материалам, приобретенным на основании прямых договоров с правообладателями. Полностью соответствует требованиям федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования к комплектованию библиотек, в том числе электронных, в части формирования фондов основной и дополнительной литературы.