

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Зоологический институт Российской академии наук**

ОДОБРЕНО
Ученым советом ЗИН РАН
протокол № 1 от 14 марта 2018 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор ЗИН РАН
Пугачев О.Н.
_____ 2018 г.





**РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ
«СВЕТООПТИЧЕСКАЯ, КОНФОКАЛЬНАЯ И
ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ (ЭПИФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ)
МИКРОСКОПИЯ В КОМПЛЕКСНЫХ
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ
ОРГАНИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ»**

По направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки

Присуждаемая квалификация: Исследователь. Преподаватель-исследователь

Присуждаемая ученая степень: Кандидат наук

	Должность	Фамилия И.О.	Подпись
Согласовано	Зам. директора по научной работе	Синев С.Ю.	
Разработано	Секретарь отдела аспирантуры	Доронин И.В.	

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Настоящая рабочая программа дисциплины по выбору «Светооптическая, конфокальная и люминисцентная (эпифлуоресцентная) микроскопия в комплексных морфологических исследованиях организации животных» - вариативная составляющая основной образовательной программы послевузовского профессионального образования (ООП ППО) разработана на основании законодательства Российской Федерации в системе послевузовского профессионального образования, в том числе: Федерального закона РФ от 22.08.1996 г. № 125-ФЗ «О высшем и послевузовском профессиональном образовании», Положения о подготовке научно-педагогических и научных кадров в системе послевузовского профессионального образования Российской Федерации, утвержденного приказом Министерства общего и профессионального образования РФ от 27.03.1998 г. № 814 (в действующей редакции); составлена в соответствии с федеральными государственными требованиями, утвержденными Приказом Минобрнауки России от 16.03.2011 г. № 1365 «Об утверждении федеральных государственных требований к структуре основной профессиональной образовательной программы послевузовского профессионального образования (аспирантура)» и инструктивного письма Минобрнауки России от 22.06.2011 г. № ИБ-733/12.

2. ТРЕБОВАНИЯ К УРОВНЮ ПОДГОТОВКИ, НЕОБХОДИМОМУ ДЛЯ ОСВОЕНИЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПОДГОТОВКИ АСПИРАНТА

Лица, желающие освоить ООП подготовки аспиранта по данному направлению подготовки, должны иметь высшее образование. Лица, имеющие высшее образование, принимаются в аспирантуру по результатам сдачи вступительных экзаменов на конкурсной основе. По решению экзаменационной комиссии лицам, имеющим достижения в научно-исследовательской деятельности, отраженные в научных публикациях, может быть предоставлено право преимущественного зачисления.

3. КВАЛИФИКАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИСЦИПЛИНЫ

Выпускник, освоивший программу аспирантуры по дисциплине «Светооптическая, конфокальная и люминисцентная (эпифлуоресцентная) микроскопия в комплексных морфологических исследованиях организации животных», должен обладать следующими

1) универсальными компетенциями (УК):

- способностью к критическому анализу и оценке современных научных достижений, генерированию новых идей при решении исследовательских и практических задач, в том числе в междисциплинарных областях (УК-1).

2) общепрофессиональными компетенциями (ОПК):

- способностью самостоятельно осуществлять научно-исследовательскую деятельность в соответствующей профессиональной области с использованием современных методов исследования и информационно-коммуникационных технологий (ОПК-1).

3) профессиональными компетенциями (ПК):

- способность вскрыть физическую, естественнонаучную сущность проблем, возникающих в ходе профессиональной деятельности, провести их структурный и функциональный анализ (ПК-2).

Квалификационные характеристики (общие и специальные) в соответствии с требованиями к выпускнику аспирантуры как специалисту высшей квалификации в отрасли Биологические науки 06.06.01.

Программа аспирантуры направлена на освоение всех видов профессиональной деятельности, к которым готовится выпускник.

4. ЦЕЛЬ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ

Цель изучения дисциплины – сформировать у слушателей понимание возможностей, особенностей и принципов устройства и работы светооптических, эпифлуоресцентных и

лазерных сканирующих конфокальных микроскопов и развить практические навыки подготовки препаратов для исследования методами светооптической, конфокальной и эпифлуоресцентной микроскопии. Для более полного анализа организации тканей, органов и функциональных систем животных необходимо комплексное морфологическое исследование с привлечением не только новейших методов конфокальной лазерной и флуоресцентной микроскопии, но и методов классической гистологии, нейрогистологии и флуоресцентной гистохимии. Настоящий курс направлен на формирование у слушателей правильного подхода к выбору тех или иных методов и их комплексов для решения поставленных задач. Основное внимание уделяется иммуноцитохимическим методам окраски тотальных препаратов и замороженных срезов, методам подготовки гистологических препаратов, а также особенностям и возможностям разных морфологических методов, их сочетаемости и недостаткам. Дисциплина должна научить слушателей правильно подбирать и сочетать в своей работе морфологические методы исследования, а также способствовать более легкому овладению других методов подготовки препаратов для светооптической, конфокальной и флуоресцентной микроскопии.

5. ОБЩИЕ Д ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИСЦИПЛИНЫ

Общий объем дисциплины по выбору «Светооптическая, конфокальная и люминисцентная (эпифлуоресцентная) микроскопия в комплексных морфологических исследованиях организации животных составляет **108** часов, или **3 ЗЕ**.

Курс читается на третьем году обучения и предполагает знание основных вузовских дисциплин гуманитарного, социального и экономического цикла (Б1), а также – естественнонаучного и математического цикла, включая раздел (Б 2).

5.1. Задачи дисциплины

- у аспирантов представления о теоретических основах флуоресцентной, светооптической и конфокальной микроскопии и об устройстве эпифлуоресцентного и конфокального микроскопов;
- сформировать у аспирантов теоретические представления о правильной фиксации объектов и изготовлении гистологических препаратов;
- сформировать теоретическое представление об иммуноцитохимической, гистохимической и нейрогистологической окрасках;
- сформировать у слушателей основы правильного подбора морфологических методов исследования, отвечающих поставленным задачам;
- сформировать теоретическое представление об иммуноцитохимической, гистохимической и нейрогистологической окрасках;
- выработать навыки, необходимые для правильного подбора реагентов и флуорохромов;
- выработать навыки, необходимые для подготовки препаратов для исследования методами светооптической, эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопии;
- выработать навыки алгоритмической обработки изображений, полученных на конфокальном и флуоресцентном микроскопах;
- подготовить аспирантов к применению полученных знаний при проведении собственных иммуноцитохимических, гистохимических или нейрогистологических (по выбору) исследований.

5.2. Требования к уровню подготовки аспиранта, завершившего изучение данной дисциплины

- иметь представление: о физических принципах эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопии; о возможностях методов флуоресцентной и светооптической

микроскопии; о теоретических основах иммуноцитохимической и гистохимической окраски или нейрогистологических методиках (по выбору)

– знать: устройство и принцип работы эпифлуоресцентных и конфокальных микроскопов; методы фиксации тканей и приготовления гистологических препаратов, иммуноцитохимическо и гистохимической окраски

– уметь: правильно подбирать методы для своего исследования, учитывая их возможности, сочетаемость и недостатки; проводить фиксацию тканей; изготавливать гистологические препараты; проводить гистохимическую и иммуноцитохимическую окраску тотальных препаратов; готовить срезы на микротоме; выполнять настройку эпифлуоресцентного и конфокального микроскопа; работать на эпифлуоресцентном и конфокальном микроскопах; проводить собственные самостоятельные исследования с использованием методов светооптической и флуоресцентной микроскопии

5.3. Связь с предшествующими дисциплинами

Курс предполагает наличие у аспирантов знаний по анатомической и общей гистологической организации животных, по строению их нервной системы, а также практических навыков работы с готовыми гистологическими препаратами на световых микроскопах.

5.4. Программа дисциплины

В процессе обучения применяются следующие образовательные технологии:

- лекции;
- семинары;
- практические занятия.

1. Лекции сопровождаются визуальным материалом в виде презентаций с использованием компьютерной презентационной программы Power Point).

2. Семинары носят характер дискуссии, собеседования, свободного изложения тематического материала.

3. На практических занятиях аспиранты работают в специализированных аудиториях и в компьютерном классе

Программа дисциплины предусматривает как аудиторные занятия, так и самостоятельную работу слушателей. Аудиторные занятия состоят из лекций и практических занятий в компьютерном классе.

Самостоятельная работа слушателей включает в себя:

- составление кратких и развёрнутых план-конспектов изучаемого материала по теме и закрепление его воспроизведением основных терминов и понятий;
- изучение учебного материала, перенесенного с аудиторных занятий на самостоятельную проработку.

Самостоятельная фиксация объектов, заключение их в парафин или целлоидин (по выбору) с последующей резкой на микротоме и приготовления постоянных гистологических препаратов. Исследование препаратов на светооптическом микроскопе. Самостоятельное приготовление и окрашивание тотальных препаратов или срезов для исследования методами эпифлуоресцентной и конфокальной микроскопии. Исследование полученных препаратов на эпифлуоресцентном и конфокальном микроскопах. Компьютерная обработка полученных изображений.

Руководство самостоятельной работой слушателей осуществляется через разработку тем, выносимых на изучение, и проверку их выполнения.

Оценочный критерий – степень самостоятельности и творческой активности при выполнении заданий.

Итоговый контроль проводится в виде зачёта.

6. СОДЕРЖАНИЕ РАЗДЕЛА (ТЕМ) ДИСЦИПЛИНЫ «КОМПЬЮТЕРНАЯ ОБРАБОТКА БИОЭКОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ»

6.1. Разделы дисциплины

№ п/п	Название раздела дисциплины
1	Общая характеристика морфологических методов изучения животных: особенности и возможности методов светооптической, флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Комплексный подход к изучению организации животных
2	Теоретические основы подготовки объектов для гистологического исследования.
3	Особенности морфологического исследования нервной системы: методология, подходы, терминология
4	Приготовление гистологических препаратов (фиксация, заключение в парафин или целлоидин, резка на микротоме, окраска). Особенности анализа нейрогистологических препаратов
5	Теоретические основы конфокальной и флуоресцентной микроскопии. Устройство эпифлуоресцентного и конфокального лазерного сканирующего микроскопов.
6	Теоретические основы иммуноцитохимии. Иммуноцитохимические методы окраски биологических образцов. Гистохимические методы окраски. Подбор антител и флуорохромов для иммуноцитохимии.
7	Работа на эпифлуоресцентном микроскопе.
8	Работа на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе.
9	Приготовление тотальных препаратов.
10	Приготовление срезов на замораживающем микротоме.
11	Алгоритмическая обработка изображений.

6.2. Темы дисциплины

Лекционный курс

Тема 1. Общая характеристика морфологических методов изучения животных: особенности и возможности методов светооптической, флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Комплексный подход к изучению организации животных.

Общая краткая характеристика различных морфологических методов исследования, сфера их применения, возможности и недостатки, правильный выбор для решения поставленных задач. Светооптические и флуоресцентные методы исследования тотальных препаратов, толстых (40 – 100 мкм), тонких (3 – 10 мкм) и полутонких (1 мкм) срезов. Особенности гистохимических и нейрогистологических методик. Подбор комплекса методов для оптимального и наиболее адекватного поставленным задачам исследования. Методы светооптической микроскопии как необходимое дополнение в исследованиях с применением флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии.

Тема 2. Теоретические основы подготовки объектов для гистологического исследования.

Основы правильной фиксации тканей. Основы приготовления срезов тканей, заключение в парафин или целлоидин: особенности и возможности. Краткая характеристика и примеры окрасок для выявления общей гистологии объектов и специфические методы гистохимии. Приготовление постоянных препаратов срезов объектов.

Тема 3. Особенности морфологического исследования нервной системы: методология, подходы, терминология. Особенности фиксации тканей для изучения строения нервной системы и рецепторных органов. Специфические методы окраски нервных элементов, их

особенности и возможности. Различные подходы к изучению нервной системы. Приготовление тотальных препаратов и серийных срезов. Нейроморфологическая терминология используемая для описания полученных результатов.

Тема 4. Теоретические основы конфокальной и флуоресцентной микроскопии. Устройство эпифлуоресцентного и конфокального лазерного сканирующего микроскопов.

Флуорохромы, спектры поглощения и испускания, правило Стокса. История флуоресцентной микроскопии. Устройство и оптическая схема эпифлуоресцентного микроскопа. Фильтры и источники освещения. Устройство и оптическая схема конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Особенности конфокальной микроскопии по сравнению с флуоресцентной микроскопией. Конфокальная апертура и ее значение. Двумерное и трехмерное сканирование, оптические срезы и стеки. Модели конфокальных микроскопов. Числовая апертура и разрешение конфокального микроскопа. Специальные методы флуоресцентной микроскопии. Двухфотонная микроскопия. Методы FRAP (восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания) и FLIP (потеря флуоресценции при фотообесцвечивании). Метод FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции).

Тема 5. Теоретические основы иммуноцитохимии. Иммуноцитохимические методы окраски биологических образцов. Гистохимические методы окраски. Подбор антител и флуорохромов для иммуноцитохимии.

Описание теоретического принципа иммуноцитохимической окраски. Антитела, применяемые в иммуноцитохимии. Выработка и очистка антител для иммуноцитохимии. Моноклональные и поликлональные антитела. Прямой и непрямой методы окраски. Виды флуорохромов. Выцветание и выгорание флуорохромов. Множественная окраска биологических образцов. Колокализация флуорохромов. Описание гистохимических методов на примере фаллотоксинов и веществ, красящих нуклеиновые кислоты. Автофлуоресценция. Подготовка биологических образцов для исследования методами конфокальной микроскопии. Фиксация. Блокирующие буферы и их значение. Дeterгенты и пермеабиллизация клеток. Среды для заливок и фотозащитные добавки. Особенности приготовления тотальных препаратов и замороженных срезов.

Практические занятия

Тема 1. Приготовление гистологических препаратов (фиксация, заключение в парафин или целлоидин, резка на микротоме, окраска). Особенности анализа нейрогистологических препаратов

Приготовление фиксаторов. Подготовка объектов для гистологического исследования с помощью светооптического микроскопа. Анализ полученных данных.

Тема 2. Работа на эпифлуоресцентном микроскопе.

Настройка эпифлуоресцентного микроскопа. Знакомство с программным обеспечением эпифлуоресцентного микроскопа. Работа на эпифлуоресцентном микроскопе.

Тема 3. Работа на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе.

Настройка конфокального микроскопа. Знакомство с программным обеспечением конфокального микроскопа. Работа на конфокальном микроскопе.

Тема 4. Приготовление тотальных аппаратов.

Фиксация тотальных препаратов. Иммуноцитохимическое и гистохимическое окрашивание тотальных препаратов для исследования на эпифлуоресцентном и конфокальном микроскопах.

Тема 5. Приготовление срезов на замораживающем микротоме.

Замораживание биологических образцов для резки на замораживающем микротоме. Работа на замораживающем микротоме. Иммуноцитохимическое и гистохимическое окрашивание срезов для исследования на эпифлуоресцентном и конфокальном микроскопах.

Тема 6. Алгоритмическая обработка изображений.

Проведение измерений на полученных изображениях. Деконволюция. Обработка изображений в графических редакторах. Сегментация изображений и трехмерные реконструкции на основе стеков, полученных на конфокальном микроскопе.

Материальное обеспечение дисциплины (Современные приборы, установки (стенды), необходимость специализированных лабораторий и классов)

- Оборудование для подготовки и исследования препаратов (замораживающий микротом, эпифлуоресцентный микроскоп, конфокальный микроскоп, светооптические микроскопы, салазочные микротомы, термостаты, вытяжной шкаф)
- Классы, оснащенные компьютерами с установленными программными пакетами Adobe Photoshop, Leica LAS AF Lite, Blender и Fiji
- Комплект реактивов для фиксации, подготовки для заключения в парафин и целлоидин, гистологические красители, батареи для окрашивания препаратов, реактивы для иммуногистохимических исследований, включая первичные и вторичные антитела, DAPI, йодистый пропиций, фаллоидин, фосфатно-солевой буфер, блокирующие буферы, детергенты
- Лабораторная посуда, пипетки, предметные и покровные стекла, иммерсионное масло

7. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Учебная и учебно-методическая литература и иные библиотечно-информационные ресурсы обеспечивают учебный процесс и гарантируют возможность качественного освоения аспирантом образовательной программы. Зоологический институт РАН располагает обширной библиотекой, включающей научно-техническую литературу по дисциплине, научные журналы и труды конференций.

Основная литература:

1. Ромейс Б. Микроскопическая техника. - М.: Иностран. лит., 1953. - 718 с
2. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. – М.: Советская наука, 1957. – 469 с.
3. Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. — СПб.: Соло, 2008.— 72 с.
- Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии. — СПб: ИНЦ

Дополнительная литература:

1. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. - М.: Иностранная литература, 1956. - 488 с.
2. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. // Успехи биол. хим., 2007. - Т. 47. - С. 371-410.
3. Buchwalow I.B., Böker W. Immunohistochemistry: basics and methods. – Springer, 2010. – 149 p.
4. Burry R.W. Immunocytochemistry. A practical guide for biomedical research. – Springer, 2010. – 223 p.
5. Conn P.M. (ed.) Techniques in confocal microscopy. Reliable lab solutions. – Academic Press, 2010. – 511 p.
6. Matsumoto B. (ed.) Cell Biological Applications of Confocal Microscopy. Methods in Cell Biology. Vol. 70. – Academic Press, 2002. – 507 p.

Электронные ресурсы:

<http://fluo-microscopy.ru/>
<http://www.microscopyu.com>
<http://www.leica-microsystems.com/>
<http://www.nature.com/nature> <http://www.nature.com/methods> <http://www.nature.com/materials> <https://www.researchgate.net/> <http://www.oxfordjournals.org>
<http://www.tandf.co.uk/journals/>
<http://www.springerlink.com> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Электронные образовательные ресурсы:

1. Научная электронная библиотека e-Library
2. www.e-science.ru – портал естественных наук, теоретическая база по биологии (бесплатный ресурс)
3. elibrary.ru и libnauka.ru (электронная библиотека Издательства "Наука").

Электронно-образовательные ресурсы свободного доступа:

1. Федеральный портал "Российское образование" – <http://www.edu.ru/>
2. Национальная педагогическая энциклопедия – <http://didacts.ru>
3. Единое окно доступа к образовательным ресурсам/Федеральный портал – <http://window.edu.ru/>
4. Портал естественных наук, теоретическая база по биологии – www.e-science.ru
5. Российская государственная библиотека – <http://www.rsl.ru>
6. Научная библиотека СПбГУ – <http://www.library.spbu.ru>
7. ЭБС издательства Лань – <http://e.lanbook.com>

Материально-техническое обеспечение учебной дисциплины

1. Чтение курса лекций осуществляется в учебной аудитории или малом конференц-зале Зоологического института РАН.
 2. Преподаватель может использовать компьютер ACER Model ZL1 с приставкой In FOCUS Model LP70 и любое иллюстративное оборудование, которым располагает ЗИН РАН.
 3. Для практических занятий используется оборудование:
 - Оборудование для подготовки и исследования препаратов (замораживающий микротом, эпифлуоресцентный микроскоп, конфокальный микроскоп, светооптические микроскопы, салазочные микротомы, термостаты, вытяжной шкаф)
 - Классы, оснащенные компьютерами с установленными программными пакетами Adobe Photoshop, Leica LAS AF Lite, Blender и Fiji
 - Комплект реактивов для фиксации, подготовки для заключения в парафин и целлоидин, гистологические красители, батареи для окрашивания препаратов, реактивы для иммуногистохимических исследований, включая первичные и вторичные антитела, DAPI, йодистый пропиций, фаллоидин, фосфатно-солевой буфер, блокирующие буферы, детергенты
 - Лабораторная посуда, пипетки, предметные и покровные стекла, иммерсионное масло
- Графический редактор (Adobe Photoshop);
- Трехмерный графический редактор (Blender или его аналог);
- Программное обеспечение флуоресцентного и конфокального микроскопов;
- Fiji (бесплатный программный пакет на основе ImageJ). Практические занятия проходят

в центре коллективного пользования и компьютерных классах ЗИН РАН, оснащенных соответствующим современным оборудованием.

4. Чтение лекций осуществляется с использованием интерактивной презентации авторской разработки.

5. Фонды Библиотеки РАН.