



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Факультет фундаментальной медицины

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

Рекомендуется для направления подготовки специальностей

060101 Лечебное дело

060301 Фармация

Квалификация (степень) выпускника «специалист»

Москва – 2016 г

Программа подготовлена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Авторы-составители: к.б.н. В.Ю. СЫСОЕВА, к.б.н., доцент Ю.П. РУБЦОВ, к.б.н., доцент Н.И. КАЛИНИНА

УДК 576:591.8

Программа по клеточной биологии и молекулярной медицине предназначена для подготовки специалистов по специальностям «фармация» и «лечебное дело» и дополнительного профессионального образования лиц, работающих в области фундаментальной биологии, медицины и фармации рассмотрена на заседаниях кафедры биохимии и молекулярной медицины, научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий и Ученого совета факультета фундаментальной медицины и рекомендована для использования в учебном процессе.

**Программа подготовлена при финансовой поддержке гранта
РНФ №14-50-00029.**

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

В соответствии с п.4.3. Федерального государственного образовательного стандарта высшего профессионального образования, специалисты по направлению подготовки «фармация» и «лечебное дело» должны быть подготовлены к научно-исследовательской деятельности. В частности, специалист-провизор должен решать профессиональные задачи, связанные с проведением самостоятельной научно-исследовательской работы, участием в решении научно-исследовательских и научно-прикладных задач по созданию новых лекарственных средств, разработке новых методов и технологий в области фармации. Изучение медико-биологических и специальных предметов, направленных на формирование этих профессиональных навыков, включая физиологию, биохимию, молекулярную биологию, фармакологию и биотехнологию, требует знаний о молекулярно-биологических процессах в клетках, структуре и функциях клеток и внутриклеточных структур, а также о взаимодействии клеток друг с другом в пределах отдельных тканей и организма в целом. Студенты, изучающие данный предмет должны знать основы биологии в объеме предмета «Биология». Обучение по программе «Клеточная биология и молекулярная медицина» способствует формированию общекультурных и профессиональных компетенций ОК-1, ПК-1, -28, -35, -36, -48 и -49, указанных в Федеральном государственном образовательном стандарте высшего профессионального образования для подготовки специалистов.

Разработка и производство препаратов генной и клеточной терапии, а также применение таких препаратов в медицине требуют знания новейших подходов молекулярной и клеточной биологии, умения оценивать их эффективность и безопасность *in vitro* и *in vivo*. Подготовка специалистов для разработки и производства препаратов передовой терапии должна происходить на базе ВУЗов, имеющих опыт подготовки медицинских работников и оснащенных современными высокотехнологичными

комплексными лабораториями с привлечением профильных научно-исследовательских организаций и экспериментальных производств. Программа носит авторский характер и уникальна для РФ.

Основная цель программы - предоставить слушателю возможность получения базовых знаний об алгоритмах разработки и внедрения в клиническую практику технологий генной и клеточной терапии и тканевой инженерии, направленных на лечение и профилактику заболеваний, включая те, для которых в настоящий момент не существует эффективных средств терапии.

После прохождения курса слушатели должны демонстрировать следующие общепрофессиональные компетенции: 1) способность использовать фундаментальные научные знания для разработки препаратов передовой терапии для лечения и профилактики заболеваний; 2) способность к поиску и анализу научно-медицинской и парамедицинской информации, отечественного и зарубежного опыта по тематике исследования; 3) способность к освоению современных теоретических и экспериментальных методов исследования с целью создания новых перспективных средств, способность к организации работ по практическому использованию и внедрению результатов исследований; 4) способность к участию в производстве лекарственных средств передовой терапии в условиях фармацевтических предприятий и организаций с соблюдением требований международных стандартов; 5) способность осуществлять разработку и испытание лекарственных средств; 6) участвовать в постановке научных задач и их экспериментальной реализации. Объем учебного времени 508 часа, из них 240 часов отводится на аудиторные занятия, в том числе, 72 часа – лекции, 12 часов – семинарские занятия, 152 часа – практические занятия, 4 часа – дифференцированный зачет, на самостоятельную работу отводится 268 часов.

Виды учебной работы включают: лекции, семинары и практические занятия. Слушателями программы могут быть лица, имеющие высшее или среднее специальное фармацевтическое, химическое, химико-технологическое, биологическое, молекулярно-биологическое, биотехнологическое, медицинское или ветеринарное образование, обладающие знаниями в области химии, биохимии, молекулярной биологии, физиологии, фармакологии, токсикологии и биомедицины.

Цели и задачи программы

предоставить слушателю возможность получения базовых знаний об алгоритмах разработки и внедрения в клиническую практику технологий генной и клеточной терапии и тканевой инженерии, направленных на лечение и профилактику заболеваний, включая те, для которых в настоящий момент не существует эффективных средств терапии. Дать представление об основах молекулярной диагностики, принципах моделирования в молекулярной медицине, методах доставки генно-терапевтических конструкций.

- сформировать представления о принципах стерильной работы, методах культивирования клеток животных и человека;
- получить представления о модификации клеток в культуре, включая индукцию их дифференцировки и плюрипотентности;
- получить представления о методах регистрации и оценки состояния клеток;
- сформировать представления об основных этапах производства препаратов для клеточной терапии, требованиях к лаборатории, методах контроля качества производимого продукта;
- подробно ознакомиться с требованиями к доклиническим испытаниям препаратов клеточной терапии;

- получить представления о существующем опыте применения препаратов клеточной терапии в международной практике;
- сформировать представления о существующих биоинженерных подходах к созданию эквивалентов тканей и органов.

Основу программы составляют различные разделы клеточной биологии, гистологии, микроскопии, биохимии, фармакологии, трансплантологии, физиологии и молекулярной медицины. К данным разделам относятся:

1. Основы клеточной теории, особенности строения клеток животных, химический состав и функции органелл клетки.
2. Особенности строения и функций тканей человека, механизмы их обновления и поддержания клеточного состава.
3. Принципы и этапы регуляции экспрессии генов в клетках человека.
4. Основы работы с рекомбинантными ДНК
5. Основные задачи биомедицинской науки в познании основных закономерностей жизнедеятельности.
6. Правила работы в лаборатории.
7. Методы выделения и культивирования клеток животных и человека.
8. Основы световой микроскопии
9. Молекулярные основы врожденных и приобретенных патологий
10. Нарушения работы генетического аппарата, коррекция мутаций
11. Классическая схема регуляции активности генов, факторы транскрипции
12. Постгеномная эра и эпигенетические механизмы
13. Клеточные и животные модели патологий человека
14. Стволовые клетки, механизмы репарации и регенерации органов и тканей
15. Использование рекомбинантных ДНК для создания генно-терапевтических препаратов

СОДЕРЖАНИЕ ПРОГРАММЫ
КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

Часть I

Структура и содержание дисциплины " Клеточные технологии и тканевая инженерия".

пп/п	Раздел дисциплины	Виды учебной работы, включая самостоятельную работу студентов и трудоемкость (в часах)				
		Лекции	Семинары	Практические занятия	Самостоятельная работа	Аттестация
1	Введение	1				
2	Тема 1. Культивирование клеток человека	7		36	24	
3	Тема 2. Модификации клеток в культуре	4		20	22	
4	Тема 3. Производство препаратов для клеточной терапии	6	2		20	
5	Тема 4. Доклинические испытания препаратов клеточной терапии	4	2		18	
6	Тема 5. Опыт применения препаратов клеточной терапии	4	2		22	
7	Тема 6. Тканевая инженерия	6		16	28	
8	Тема 7. Принципы световой микроскопии и формирования изображения	4		4		
9	Дифференцированный зачет					2
	Всего:	36	6	76	134	2
	Итого:	254				

Содержание разделов дисциплины " Клеточные технологии и тканевая инженерия".

Введение.

Механизмы регенерации тканей *in vivo*. Регенерация и репарация. Специализированные и стволовые клетки человека в возобновлении состава тканей. Гематопоэтические стволовые клетки. Мезенхимные стволовые клетки. Резидентные стволовые клетки сердца, эпителия кожи, печени и кишечника. История методов культивирования клеток человека и животных. Цели и задачи клеточной терапии и тканевой инженерии. Правовые и этические аспекты применения препаратов клеточной терапии. Основные направления развития регенеративной медицины.

Тема 1. Культивирование клеток человека

Принципы стерильной работы с культурой клеток, применяемые методы стерилизации: фильтрация, автоклавирование, антисептические растворы, гамма- и УФ- стерилизации. Параметры микроклимата при культивировании клеток. Устройство оборудования для культивирования клеток: ламинарные шкафы I – III классов защиты, инкубаторы, роботизированные линии для культивирования клеток, изоляторы, микроскопы, вспомогательное оборудование. Выбор пластиковой посуды для культивирования клеток. Состав и приготовление питательных сред. Базовые компоненты сред: аминокислоты, витамины, моносахариды, неорганические соли, микроэлементы. Ростовые добавки, сыворотки и их заменители. Гормоны, регулирующие рост определенных типов клеток. Осмотическое давление и pH сред, применяемые буферные системы. Типы сывороток, их минеральный и белковый состав, основные функции, выполняемые сывороткой в ходе культивирования клеток. Инактивация системы комплемента. Культивирование клеток без сыворотки, адаптация к

бессывороточному культивированию. Специализированные среды: без ксеногенных добавок, для терапевтического культивирования; не содержащие белков, для продукции рекомбинантных факторов; среды химически определенного состава. Критерии подбора среды для культивирования.

Характеристика и подбор доноров.

Источники клеток для культивирования. Банки клеточных культур. Дифференцированные и прогениторные клетки постнатальных тканей: фибробласты, эндотелий, лимфоциты, гепатоциты, гематопозитические стволовые клетки; мезенхимные стволовые клетки из разных тканей; стволовые клетки сердца. Перевод клеток в культуру, получение первичных культур. Суспензионные, прикрепленные и эксплантные культуры на примерах получения культур лимфоцитов, мезенхимных стромальных клеток и фибробластов кожи. Ферменты, используемые для получения первичных культур. Зависимость состава популяции клеток от метода выделения и используемых ферментов. Применение гомогенизаторов при получении первичных культур. Иммунотипирование и селективное выделение субпопуляций с помощью иммуномагнитной сортировки, лазерной диссекции и проточного цитометра, совмещенного с сортером. Методы подсчета клеток и определения их жизнеспособности. Использование селективно накапливаемых красителей, МТТ-теста.

Механизмы адгезии клеток. Белки внеклеточного матрикса, их взаимодействие с клетками. Эффективность прикрепления клеток. Выбор подложек и матриксов при культивировании слабоадгезивных культур. Субкультивирование клеток, основные параметры клеточных культур – морфология, время удвоения, кривые роста, жизнеспособность, плотность культивирования, кариотип, иммунофенотип, специфическая активность. Замораживание и размораживание клеток. Длительное хранение клеток и

создание банков клеточных культур. Криопротекторы, принцип их действия, ограничения в применении. Контаминация клеток. Виды контаминаций: плесневые грибы, дрожжи, бактерии, вирусы, микопlasма, кросс-контаминация клетками других культур. Прямое и косвенное определения контаминаций культур. Источники контаминации. Способы предотвращения заражения культур. Карантин. Правила уничтожения контаминированных культур.

Культивирование клеток при различном содержании кислорода. Физиологический уровень кислорода в различных тканях. Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1alpha), его регуляция в клетке. Химические стабилизаторы HIF-1alpha. Влияние содержания кислорода на пролиферацию, дифференцировку, устойчивость к стрессам и секреторную активность культивируемых клеток на примере мезенхимных стромальных клеток. Моделирование гипоксии и реоксигенации *in vitro*. Использование гипоксического прекондиционирования для повышения терапевтической эффективности клеток.

Тема 2. Модификации клеток в культуре

Назначение модификаций клеток. Получение специализированных клеток, повышение их специфической активности, получение иммортализованных линий, индукция плюрипотентности. Повышение специфической активности клеток с помощью генетических модификаций, химических веществ. Доставка нуклеиновых кислот в культивируемые клетки. Методы химической, физической и вирусной доставки: липофекция, нуклеофекция, электропорация, магнитофекция, спинфекция, применения ультразвука, наночастиц. Основные препятствия доставки и методы преодоления. Понятие об эффективности трансфекции и эффективности экспрессии трансгена.

Способы получения специализированных клеток. Направленная дифференцировка клеток, способы индукции *in vitro*. Примеры индукции дифференцировки с помощью гормонов и химических веществ: остеогенная, хондрогенная и адипогенная дифференцировки мезенхимных стромальных клеток. «Быстрый» и «медленный» способы оценки эффективности дифференцировки клеток. Перепрограммирование клеток. Индукция заданного фенотипа, индукция плюрипотентности. Способы оценки эффективности индукции плюрипотентности. Использование индуцированных плюрипотентных клеток для получения дифференцированных культур: модели для изучения свойств клеток, тестирование лекарственных препаратов (частичное замещение использования лабораторных животных). Совместное культивирование (сокультивирование) клеток. Механизмы влияния клеток друг на друга, области применения методов сокультивирования клеток.

Индукцированные плюрипотентные клетки. Плюрипотентность клеток, механизмы перепрограммирования генома. Методы оценки остаточного присутствия плюрипотентных клеток в культурах после индукции дифференцировки. Возможные области применения индуцированных плюрипотентных клеток в клеточных технологиях. Использование «фидеров» при культивировании плюрипотентных клеток, получение «фидерных культур».

Тема 3. Производство препаратов для клеточной терапии

Препараты клеточной терапии для лечения сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, аутоиммунных заболеваний, а также заболеваний эндокринной системы. Система банков тканей и органов на случай чрезвычайных ситуаций. Классификация препаратов для клеточной терапии. Некомбинированные и комбинированные. Генетически модифицированные и немодифицированные. Классификация на основе механизма реализации

основного терапевтического воздействия (препараты, оказывающие метаболическое, фармакологическое и иммунологическое воздействие, или стимулирующие репарацию поврежденной ткани вследствие дифференцировки и встраивания в ткань реципиента). Происхождение клеток (аутологичные, аллогенные, смесь аутологичных и аллогенных клеток). Оценка потенциальной и реальной автономности клеточных препаратов после введения их в организм человека. Под автономностью следует понимать их способность длительно (дольше, чем требуется) персистировать в организме человека, располагаться вне органов-мишеней и, тем самым, нарушать функцию других органов, включать/выключать жизненно важные функции организма и т.д. Последствиями этих явлений могут быть канцерогенез, туморогенез, неконтролируемая экспрессия трансгена (особая опасность возникает, если продукт трансгена является фактором роста или иным веществом, влияющим на клеточный цикл), нарушение функции здоровых тканей, контаминация других людей/животных.

Организация производства препаратов для клеточной терапии.
Правила GMP в отношении производства клеток, правила GTP. Требования к помещениям, оборудованию, оснащению и персоналу. Служба контроля качества препаратов. Жизненный цикл продукта. Дизайн процесса. Валидация производственного процесса. Постоянная верификация процесса. Валидационные характеристики препаратов клеточной терапии. Специфичность (specificity) – способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце. Недостаток специфичности испытания может быть компенсирован другим (другими) дополнительным(и) испытанием(ями). Правильность или точность (accuracy, trueness) - степень соответствия между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным по данной методике. Прецизионность (precision) метода - степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений,

выполненных данным методом на различных пробах одного и того же однородного образца, в случае если результат можно представить в виде количественной характеристики. Уровни прецизионности: сходимость, внутрилабораторная прецизионность и воспроизводимость. Статистические характеристики прецизионности метода (дисперсия, стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение). Сходимость (repeatability) - прецизионность метода при ее выполнении в одних и тех же условиях в течение небольшого промежутка времени. Внутрилабораторная прецизионность (intermediate precision) - влияние внутрилабораторных вариаций: различные дни, различные аналитики, различное оборудование и т.д. Воспроизводимость (reproducibility) характеризует прецизионность в межлабораторном эксперименте (совместные исследования, обычно применяемые для стандартизации метода). Предел обнаружения (detection limit) - минимальное количество анализируемого вещества в образце, которое может быть обнаружено. Предел количественного определения (quantitation limit) - минимальное количество анализируемого вещества (субстанции, количество клеток в популяции) в образце, которое может быть количественно определено с требуемой правильностью и прецизионностью. Предел количественного определения является валидационной характеристикой методик количественного определения малых концентраций веществ в образце и рассматривается в основном при определении примесей и/или продуктов разложения. Линейность (linearity) – способность метода получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце. Диапазон применения (range) - интервал между минимальной и максимальной концентрациями (количествами) анализируемой популяции клеток в образце, для которого показано, что аналитическая методика имеет требуемую прецизионность, правильность и линейность. In-line валидация – метод осуществления измерений, при котором образец анализируется внутри

технологического потока и не изымается из него. On-line – метод осуществления измерений, при котором образец изымается из производственного процесса и больше не возвращается в технологический поток. At-line – метод осуществления измерений, при котором образец изымается, изолируется и анализируется в непосредственной близости от технологического потока. Ведение документации.

Методы оценки качества препаратов клеточной терапии.
Подлинность продукта. Генетические и фенотипические характеристики клеточных линий. Генетические характеристики включают определение видовой принадлежности клеток гибридизацией *in situ* и молекулярно-генетическое подтверждение наличия в клетках плазмидного или иного вектора, содержащего экспрессирующие гены, если клетки (клеточные линии) были генетически модифицированы. Фенотипические характеристики включают перечень экспрессируемых клетками поверхностных антигенов, определяемых с помощью специфических моноклональных антител методом проточной цитофлуориметрии по стандартам ISCT. Плавающий характер фенотипических характеристик на примере МСК жировой ткани. Подтверждение специфической активности. Критерии выбора методов оценки активности. Методы определения стерильности и жизнеспособности. Стабильность. Иммунофенотип стволовых клеток, морфология клеток (средний размер, зернистость) и жизнеспособность. Паспорт препарата клеточной терапии.

Тема 4. Доклинические испытания препаратов клеточной терапии

Основные цели проведения доклинических исследований БМКП. Закон «О биомедицинских клеточных продуктах». Проверка биологического действия (специфической активности). Определение биологически активных доз (дозозависимости). Выбор потенциальной начальной дозы, схемы повышения доз и выбора режима дозирования в клинических исследованиях.

Установление выполнимости предлагаемого клинического пути введения и его приемлемой безопасности. Обоснование критериев отбора пациентов в клинические исследования. Определение физиологических параметров, подлежащих контролю в ходе клинического наблюдения. Выявление потенциальных рисков для общественного здоровья (например, для населения в целом, ухаживающих лиц, членов семьи, близких и интимных контактов). Исследование специфического механизма действия препаратов клеточной терапии. Выбор моделей для исследования биологических эффектов. Фенотипические и генетические маркеры, физические и морфологические свойства клеток. Фармакодинамика и фармакокинетика/биораспределение клеток, вспомогательных веществ и дополнительных активных ингредиентов. Биохимические и иные маркеры, позволяющие судить о функциональной активности приживляемых клеток и их выживаемости в процессе дифференцировки в реципиентной ткани.

Исследование эффективности и безопасности клеточного препарата.

Критерии, позволяющие судить о положительном влиянии клеточного препарата на течение, продолжительность заболевания или его предотвращение, реабилитацию пациента. Обоснование выбора доз клеточных препаратов. Оценка трансдифференцировки клеток, входящих в состав препарата. Определение оптимальных условий и времени хранения препарата клеточной терапии, при которых сохраняется его терапевтическое действие. Исследование безопасности препарата клеточной терапии. Оценка зараженности инфекционными агентами (вирусами, бактериями, микоплазмами) и прионными белками, контаминации клетками других линий, компонентами питательной среды и эндотоксинами. Особенности использования питательных сред, растворов и материалов для культивирования клеток в терапевтических целях. Оценка способности клеток, входящих в состав препарата, трансформироваться в опухолевые клетки или вызывать опухолеобразование в тех условиях, в которых они

должны функционировать в пораженной ткани. Оценка возможного тератогенного действия препарата клеточной терапии. Анализ иммунологической безопасности препарата клеточной терапии. Иммунологическая безопасность питательной среды, используемой для получения препарата клеточной терапии. Подтверждение отсутствия очагов клеток, несоответствующих ткани в который вводят препарат клеточной терапии. Безопасность и обоснованность включения в состав препарата клеточной терапии фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ. Оценка достоверности результатов доклинических исследований.

Тема 5. Опыт применения препаратов клеточной терапии в клинической практике

Биологические основы клеточных технологий. Стволовые и прогениторные клетки, классификация. Внутриклеточные механизмы, обуславливающие пластичность, дифференцировку и репрограммирование. Эпигенетика, микроРНК. Примеры резидентных (тканевых) стволовых клеток. Понятия «ниши стволовой клетки», мобилизации, направленной миграции (хоуминга). Взаимодействие клеток «ниши» и стволовых клеток. Мобилизация стволовых клеток из тканевых депо, обогащение, выделение из тканей и манипуляции *in vitro*. Применение клеточных технологий в медицине. Направленная иммунокоррекция. Стимуляция ангиогенеза. Терапия злокачественных заболеваний. Разработка протоколов клинических испытаний методов клеточной терапии. Существующие протоколы клеточной терапии: перспективы и ограничения.

Клеточная терапия сердечно-сосудистых заболеваний. Способность миокарда к самообновлению и регенерации. Стволовые клетки сердца, их идентификация *in vivo*. Распределение прогениторных клеток сердца в миокарде. Источники получения стволовых клеток сердца. Особенности культивирования. Обновление и восстановление миокарда человека. Участие стволовых клеток сердца и нерезидентных прогениторных клеток в

обновлении и восстановлении миокарда. Вклад циркулирующих прогениторных клеток в регенерацию миокарда. Способы трансплантации клеток для стимуляции регенерации миокарда. Механизмы действия клеточных препаратов: паракринное влияние, дифференцировка, перепрограммирование. Терапевтический ангиогенез. Применение препаратов клеточной терапии для стимуляции терапевтического ангиогенеза.

Клеточная терапия неврологических заболеваний. Механизмы регенерации нервной системы. Нейральные стволовые клетки. Применение мезенхимных стромальных клеток для лечения неврологических заболеваний и стимуляции регенерации периферических нервов. Применение внеклеточных везикул культивируемых клеток для терапии неврологических заболеваний (на примере везикул, продуцируемых мезенхимными стромальными клетками). Препараты клеточной терапии в ортопедии. Стимуляция регенерации хрящей. Препараты клеточной терапии для регенерации повреждений кожи как альтернатива тканеинженерным конструкциям (биоэквивалентам кожи).

Тема 6. Тканевая инженерия

Основные направления регенеративной медицины. Выращивания живого эквивалента кожи, клеточные препараты для лечения поражений роговицы, костного мозга, костей, хряща, уретры, мочевого пузыря, трахеи. Источники клеток для создания тканеинженерных конструкций: клетки амниотической жидкости, плаценты, пуповинной крови. Стволовые и прогениторные клетки постнатальных тканей: гематопозитические стволовые клетки; мезенхимные стволовые клетки; фибробласты кожи, стволовые клетки сердца, печени, эпителия кожи и кишечника, нейральные предшественники из назального эпителия. Создание тканеинженерных конструкций. Культивирование клеток для создания многоклеточных

тканевых структур. Выбор биореактора: основные типы, принципы работы и рекомендации выбора. Биопринтеры: печать тканевых структур.

Биоматериалы и матриксы. Природные матриксы; синтетические полимеры; гибридные, композитные и комплексные биоматериалы. Модификация поверхности биоматериалов. Взаимодействие клеток с субстратом. Биосовместимость и биологический ответ на материалы тканеинженерных конструкций. Применение тканеинженерных конструкций в медицине. Конструирование кровеносных сосудов крупного и мелкого диаметров. Сборка кровеносных сосудов в тканях и тканеинженерных конструкциях. Конструирование миокарда. Восстановление роговицы глаза. «Пласты» клеток.

Примеры тканеинженерных конструкций. Тканеинженерные конструкции для протезирования отделов пищеварительного тракта. Тканеинженерные конструкции при печеной и почечной недостаточностях. Конструирование репродуктивной системы. Имплантаты для восстановления костных дефектов. Конструирование хрящевой ткани, связок, фаланг. Подходы тканевой инженерии для регенерации центральной нервной системы и периферических нервов. Регенеративная терапия скелетных мышц. Инженерия тканей зуба. Подходы для создания тканевых эквивалентов кожи. Тканеинженерная конструкция поджелудочной железы.

Тема 7. Принципы световой микроскопии и формирования изображения

Типы световых микроскопов. Стереомикроскопы, операционные, лабораторные, рутинные и исследовательские микроскопы, Обзор производителей микроскопов. Устройство светового микроскопа, источники света, объективы, окуляры, конденсоры, настройка света по Келеру, методы контрастирования, детекторы, цифровые камеры, разрешающая способность, числовая апертура.

Основы флуоресцентной микроскопии. Флуоресценция, принципы работы и

основные сведения об эпифлуоресцентном микроскопе. Фильтры и флуоресцентные красители. Аутофлуоресценция. Иммуноокрашивание клеток и тканей – общие принципы. Теоретические основы метода иммунофлуоресцентного окрашивания. Характеристика антител, конъюгирование антител с флуорохромами, схемы иммуноокрашивания. Обзор коммерческих антител. Подготовка образцов для микроскопического исследования. Общие принципы работы с криостатом, микротомом, вибратором и ультратомом. Маркировка образцов. Особенности формирования и подготовки срезов тканей для разных методов окраски и анализа. Работа с препаратами большой толщины (тотальные препараты). Предметные и покровные стекла. Хранение срезов и блоков с образцами. Архивы препаратов. Фиксация окрашивание и заключение срезов тканей и клеток. Основные способы фиксации тканей. Базовые принципы разных методов окраски срезов. Гистологические окраски, иммуногистохимия. (флуоресценция и пероксидазная реакция). Прижизненные красители. Реагенты предотвращающие выгорание флуоресцентных красителей.

Задачи практических занятий "Клеточная терапия и тканевая инженерия":

Тема 1. Культивирование клеток человека

- Принципы стерильной работы с культурой клеток, применяемые методы стерилизации. Оборудование для культивирования клеток. Организация работы в лаборатории или на производстве, связанных с культивированием клеток человека.
- Приготовление сред и растворов для культивирования клеток. Размораживание суспензионных клеток.
- Оценка жизнеспособности культивируемых клеток и подсчет их количества с помощью счетчика клеток и окрашивания трипановым синим.

Определение доли жизнеспособных и апоптотических клеток в культуре с помощью проточного цитометра.

- Получение первичной культуры фибробластов кожи человека: метод эксплантной культуры и метод ферментативной диссоциации.
- Замораживание культивируемых клеток в растворе ДМСО. Знакомство с системами длительного хранения клеточных культур.
- Анализ пролиферации и кривой роста культивируемых клеток.

Тема 2. Модификация клеток в культуре

- Трансфекция клеток с помощью липофекции.
- Трансфекция клеток с помощью электропорации.
- Индукция остеогенной (адипогенной) дифференцировки мезенхимных стромальных клеток.
- Оценка эффективности модификации клеток.

Тема 6. Тканевая инженерия

- Конструирование клеточных пластов.
- Индукция формирования сосудоподобных структур в трехмерной системе.

Тема 7. Принципы световой микроскопии и формирования изображения

- Техника безопасности при работе с микроскопами, Основные узлы и детали светового микроскопа, настройка света по Келеру, Фазовый контраст, поляризационная и DIC микроскопия, апертурная и полевая диафрагма, окуляры. Механические и моторизованные микроскопы, работа с программой управляющей узлами микроскопа.

- Препаратодержатели и препаратоводители. Получение изображения в проходящем свете с использованием разных методов контрастирования.
- Фиксация образцов тканей животных. Получение замороженных образцов.
- Изготовление криосрезов разной толщины. Маркировка предметных стекол. Изготовление срезов разных тканей при разных температурных режимах.
- Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных клеток и срезов тканей. Особенности фиксации. Особенности иммунохимического окрашивания с использованием гистохимических красителей. Заключение препаратов. Титрование первичных антител, демаскировка антигена. Ядерные красители.
- Флуоресцентный микроскоп. Источник света, фильтры, получение изображения в отраженном свете. Получение изображений в нескольких каналах, наложение, обработка изображений.

Темы семинаров:

Тема 3. Производство препаратов для клеточной терапии

- Правила GMP и GTP.

Тема 4. Доклинические испытания препаратов клеточной терапии

- Планирование протокола клинических исследований эффективности и безопасности на основании данных, полученных при проведении доклинических исследований.

Тема 5. Опыт применения препаратов клеточной терапии

- Оценка результатов клинических исследований эффективности и безопасности препаратов клеточной терапии

При реализации образовательных технологий используются следующие виды самостоятельной работы:

- работа с конспектом лекции (обработка текста);
- подготовка к лекциям, семинарам и практическим занятиям;
- работа над материалом учебника;
- самостоятельная работа с клетками первичной культуры.
- Самостоятельное изготовление и окрашивание срезов тканей.
- поиск информации по тематике занятия в сети «Интернет» и литературе;
- подготовка к контрольному опросу;
- подготовка к сдаче зачета.

Самостоятельная работа студентов состоит в проработке лекционного материала, рекомендованной литературы и Интернет-ресурсов, составление конспекта дополнительных материалов по темам, вынесенным на самостоятельное изучение, подготовке к семинарским и практическим занятиям, подготовке к зачету.

Студенты по дисциплине "Клеточные технологии и тканевая инженерия" должны самостоятельно подготовить, представить и обсудить на семинарских занятиях: перечень ключевых пунктов организации производства клеточных препаратов в соответствии с нормами GTP и GMP; анализ проведенных доклинических исследований предполагаемого препарата клеточной терапии и прогноз его клинических и дополнительных доклинических исследований; оценку результатов клинических исследований эффективности различных препаратов клеточной терапии (или подходов к применению похожих препаратов) при лечении какого-либо заболевания (в сравнении с принятыми в настоящий момент подходами),

уделив особое внимание возможным рискам, осложнениям и вероятности успеха.

Примерный перечень разделов программы, которые студенты должны изучить самостоятельно:

- Автоматизированное культивирование при производстве препаратов для клеточной терапии
- Иммуноселекция vs. микродиссекция. Сравнение возможностей и применимости для производства препаратов для клеточной терапии
- Внеклеточные везикулы в регенерации тканей как альтернатива препаратам клеточной терапии
- Нормы GMP и GTP в отношении производства препаратов клеточной терапии
- Клинические исследования эффективности и безопасности препаратов клеточной терапии
- Опыт трансплантации тканеинженерных конструкций

Для аттестации по итогам освоения дисциплины "Клеточная терапия и тканевая инженерия" учебным планом предусмотрен зачет, в котором используются ниже перечисленные вопросы:

1. Стволовые и прогениторные клетки, классификация. Эмбриональные стволовые клетки. Резидентные стволовые клетки.
2. Ниша стволовой клетки, ее роль в регуляции стволовых клеток.
3. Мобилизация, направленная миграция (homing).
4. Дифференцировка. Эпигенетические изменения при дифференцировке
5. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Механизмы репрограммирования.

6. Основы стерильной работы с культурами клеток. Оборудование для культуральной лаборатории.
7. Принципы разработки сред для культивирования клеток. Бессывороточные среды и среды определенного химического состава.
8. Получение первичных культур. Примеры суспензионных и прикрепленных культур, которые могут быть использованы в терапии
9. Получение клеточных препаратов: выделение из тканей и манипуляции *in vitro*.
10. Обогащение и очистка клеточных препаратов. Иммуноселекция, селективное культивирование
11. Основные процессы, через которые осуществляется васкуляризация тканей в постнатальном организме.
12. Цели клеточной терапии неврологических заболеваний, основные неврологические заболевания – мишени клеточной терапии.
13. Механизмы терапевтических эффектов клеточных препаратов
14. Цели и подходы к применению клеточных технологий в кардиологии.
15. Типы стволовых/прогениторных клеток, используемых для терапии сердечно-сосудистых заболеваний.
16. Основные типы клеток, используемых для клеточной терапии неврологических заболеваний.
17. Нейральные стволовые клетки, локализация, пути дифференцировки.
18. Способы трансплантации клеточных препаратов при неврологических заболеваниях.
19. Возможности использования внеклеточных везикул в диагностике и терапии

20. Основные задачи и принципы тканевой инженерии
21. Тактика терапевтического ангиогенеза, определение, основные подходы.
22. Примеры применения продуктов тканевой инженерии в медицине
23. Требования, предъявляемые к клеточным препаратам. Клеточный паспорт.
24. Проблемы получения клеточных препаратов на основе стволовых клеток.
25. Способы введения клеточных препаратов в ткани и органы
26. Механизмы терапевтического эффекта клеточных препаратов
27. Основные задачи и принципы тканевой инженерии
28. Виды продуктов тканевой инженерии, разрабатываемых для клинического применения
29. Примеры применения продуктов тканевой инженерии в медицине

Структура и содержание дисциплины " Молекулярная медицина".

пп/п	Раздел дисциплины	Виды учебной работы, включая самостоятельную работу студентов и трудоемкость (в часах)				
		Лекции	Семинары	Практические занятия	Самостоятельная работа	Аттестация
1	Введение	1				
2	Тема 1. Молекулярные основы врожденных и приобретенных патологий	7		36	24	
3	Тема 2. Нарушения работы генетического аппарата, коррекция мутаций	4		20	22	
4	Тема 3. Классическая схема регуляции активности генов, факторы транскрипции	6	2		20	
5	Тема 4. Постгеномная эра и эпигенетические механизмы	4	2		18	
6	Тема 5. Клеточные и животные модели патологий человека	4	2		22	
7	Тема 6. Стволовые клетки, механизмы репарации и регенерации органов и тканей	6		16	28	
8	Тема 7. Использование рекомбинантных ДНК для создания генно-терапевтических препаратов	4		4		
9	Дифференцированный зачет					2
	Всего:	36	6	76	134	2
	Итого:	254				

Содержание разделов дисциплины "Молекулярная медицина"

Введение

Связь между генетическим материалом клетки и молекулярным составом, регуляция экспрессии генов, как способ поддержания фенотипа клеток и изменения их свойств. Самообновление клеток и механизмы репарации и регенерации тканей *in vivo*. Специализированные и стволовые клетки человека в возобновлении состава тканей. Изменения в ДНК и, как следствие, в РНК и белках, – основная причина возникновения врожденных и приобретенных патологий. Молекулярная медицина: способы выявления изменений в составе ДНК и белков, поиск молекул-мишеней для новых лекарств, коррекция мутаций в ДНК и использование генов в качестве лекарственных препаратов, способы регуляции активности отдельных генов в масштабе клетки, органа, организма.

Тема 1. Молекулярные основы врожденных и приобретенных патологий

1. Молекулярные основы наследственности. Строение нуклеиновых кислот. Принцип комплементарности, правило Чаргаффа, двойная спираль ДНК, пространственная структура РНК. Упаковка ДНК в хроматине. Минорные нуклеотиды и метилирование ДНК. Репликация ДНК. Ошибки репликации, как источник мутаций.

2. Транскрипция ДНК. Общие понятия о структуре генов: промоторы и терминаторы транскрипции, типы промоторов, связь со структурой хроматина. Эnhансеры и сайленсеры. РНК-полимеразы. Строение транскрипционного аппарата. Инициация, элонгация и терминация транскрипции, способы регуляции активности транскрипционного аппарата. Факторы транскрипции, вторичные посредники. Способы передачи сигналов от рецепторов к генам.

3. Созревание и процессинг мРНК, кэпирование, полиаденилирование, сплайсинг, транспорт из ядра в цитоплазму. Сигналы, определяющие распределение РНК в клетке, регуляция стабильности мРНК и участия их в трансляции.

4. Синтез белка, транспортные РНК, аминоацил-тРНК и аминоацил-тРНК синтетазы, основные сигналы в мРНК, необходимые для успешной трансляции. Инициация трансляции эукариот по классическому и кэп-независимому механизму. Элонгация и терминация трансляции. Точность трансляции, сдвиг рамки считывания и его последствия, деградация мРНК с преждевременными стоп-кодонами.

5. Связь между нарушениями репликации, транскрипции и трансляции с патологией. Примеры заболеваний, механизм развития которых связан с нарушениями работы генов на разных уровнях.

Тема 2. Нарушения работы генетического аппарата, коррекция мутаций

1. Клеточный цикл. Контрольные пункты (checkpoints) клеточного цикла, связь с репликацией ДНК и митозом. Молекулярные механизмы, отвечающие за остановку репликации ДНК и митоза. Рекомбинация ДНК. Механизмы репарации поврежденной ДНК. Случайный и направленный мутагенез. Мутагенез *in vitro*.

2. Мутагенез и нарушения репликации – основная причина канцерогенеза. Хромосомные перестройки. Белок p53, онкогены и антионкогены. Способы выявления изменений в ДНК и картирования геномных перестроек.

3. Методы внесения мутаций и коррекции мутаций в ДНК. Система Cre-lox, нуклеазы на основе доменов «цинковый палец», система CRISPR-Cas9.

Тема 3. Классическая схема регуляции активности генов, факторы транскрипции

1. Строение генов, кодирующих разные типы РНК. События, которые предшествуют активации транскрипции. Связь между активностью генов и структурой хроматина. Строение промоторов и удаленных регуляторных элементов в ДНК. Факторы транскрипции, участки связывания факторов транскрипции и основные ДНК-связывающие домены. Способы регуляции экспрессии генов на стадии транскрипции путем изменения количества и активности факторов транскрипции. Передача сигнала от рецепторов на поверхности клетки в ядро. Ядерные рецепторы.

2. Экспериментальные подходы изучения активности генов. Методы выделения и анализа РНК из клеток и тканей. Обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция, полимеразная цепная реакция в реальном времени, микрочипы на основе ДНК олигонуклеотидов. Гибридизация РНК и ДНК. Способы определения активности генов с помощью репортерных конструкций, идентификация участков связывания факторов транскрипции в ДНК. Иммунопреципитация хроматина и секвенирование следующего поколения.

3. Регуляция экспрессии генов на пост-транскрипционном уровне. Альтернативное полиаденилирование и сплайсинг, сигналы стабильности и нестабильности в РНК. Ключевые РНК-связывающие белки. Механизм экспорта РНК из ядра в цитоплазму как способ контроля количества транслируемой РНК. микроРНК и РНК-интерференция. Биогенез микроРНК и их участие в регуляции ключевых клеточных процессов. Использование РНК-интерференции с целью регуляции активности генов, генетический нокдаун. Способы введения микроРНК в клетку, малые шпилечные РНК, антагонисты микроРНК. Другие малые некодирующие РНК в регуляции активности генов.

Тема 4. Постгеномная эра и эпигенетические механизмы

1. Геном человека. Секвенирование генома человека и животных. Проблема избыточности генома. Мобильные генетические элементы и участки генома, не кодирующие информации о белках. Гены малых РНК. Новые подходы к анализу сложных смесей нуклеиновых кислот и белков. Биоинформатика и проблема хранения и анализа big data.

2. Эпигенетические механизмы регуляции активности генов и структуры хроматина. Метилирование ДНК, альтернативные формы гистонов, модификации гистонов, гистоновый код и его «чтение». Эпигенетическая регуляция поддержания стволовости клеток и участие в дифференцировке клеток. Создание энциклопедий эпигенетических модификаций и регуляторных мотивов в ДНК ENCODE.

Тема 5. Клеточные и животные модели патологий человека

1. Проблема поиска новых мишеней для лекарственных препаратов. Клеточные модели для разработки и тестирования новых лекарств. Иммуортализованные линии клеток, индуцированные плюрипотентные клетки и перспективы их использования для создания *in vitro* моделей патологий человека. Примеры животных моделей значимых заболеваний человека на примере аутоиммунных заболеваний.

2. Модельные организмы. Использование модельных организмов для создания моделей заболевания человека. Основные подходы к созданию трансгенных животных, использование направленной модификации генома и репортерных конструкций. Преимущества и недостатки модельных организмов.

Тема 6. Стволовые клетки, механизмы репарации и регенерации органов и тканей

1. Эмбриональные стволовые и мультипотентные клетки. Проблема обновления и поддержания стволовости. Молекулярные основы стволовости,

эпигенетические факторы, отвечающие за поддержание недифференцированного состояния. Связь пролиферативного потенциала стволовых клеток с репарацией и регенерацией тканей и старением. Индуцированные плюрипотентные клетки.

2. Дифференцировка клеток. Факторы транскрипции – мастер-регуляторы дифференцировки клеток в определенном направлении. Внешние сигналы, отвечающие за дифференцировку клеток. Роль микроокружения и клеточной «ниши». Гемопоз как иллюстрация дифференцировки клеток из общего предшественника.

3. Ключевые процессы, лежащие в основе репарации тканей и органов. Процессы, происходящие в поврежденной ткани. Вклад воспаления и клеток иммунной системы. Растворимые факторы, способствующие репарации тканей. Участие резидентных стволовых клеток ткани и мезенхимных стромальных клеток в восстановлении ткани. Программируемая клеточная смерть. Поддержание клеточного состава ткани: баланс между апоптозом, дифференцировкой и пролиферацией клеток. Аутофагия как способ поддержания жизнеспособности клеток. Прямое перепрограммирование клеток, минуя стадию стволовости.

Тема 7. Использование рекомбинантных ДНК для создания генно-терапевтических препаратов

1. Основы генетической инженерии для создания рекомбинантных конструкций на основе ДНК. Плазмидные векторы для экспрессии генов. Вектора для доставки рекомбинантных генов в клетки разных типов. Использование вирусов и рекомбинации ДНК для стабильной интеграции чужеродной ДНК в геном хозяина.

2. Лабораторные методы анализа нуклеиновых кислот и белков. Электрофоретические методы, методы иммунодетекции. Флуоресцентные белки и ферменты, используемые в качестве репортеров.

3. Способы доставки терапевтических генов в клетки. Выделение клеток, синтезирующих экзогенные белки с помощью сортировки клеток на проточном цитометре. Анализ продукции экзогенного белка с помощью иммуноферментного анализа, Вестерн-блоттинга с последующей иммуновизуализацией, масс-спектрометрии. Способы повышения экспрессии трансгена: оптимизация последовательности и выбор вектора.

Задачи практических занятий предмета "Молекулярная медицина":

Тема 2. Нарушения работы генетического аппарата, коррекция мутаций (Редактирование генома с использованием системы CRISPR-Cas9)

- Принципы стерильной работы с культурой клеток, применяемые методы стерилизации. Оборудование для культивирования клеток. Организация работы в лаборатории или на производстве, связанных с культивированием клеток человека.
- Приготовление сред и растворов для культивирования клеток. Размораживание суспензионных клеток.
- Оценка жизнеспособности культивируемых клеток и подсчет их количества с помощью счетчика клеток и окрашивания трипановым синим. Оценка уровня бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста.
- Дизайн последовательности guide RNA к выбранному гену
- Поиск *in silico* возможных сайтов модификации off-target
- Введение в линейные клетки млекопитающих конструкции, содержащей Cas9, guide RNA и репортерного белка GFP

- Оценка степени модификации гена-мишени с использованием метода ПЦР и секвенирования продуктов ПЦР

Тема 3. Классическая схема регуляции активности генов, факторы транскрипции

- Выделение смеси тотальной РНК с помощью реагента TRIZOL
- Анализ тотальной РНК методом гель-электрофореза в агарозном геле
- Обратная транскрипция (синтез тотальной кДНК) с использованием random праймера
- ПЦР и анализ продуктов ПЦР, полученных с помощью специфических праймеров к выбранной кДНК, в режиме реального времени (real-time PCR)

Тема 3. Классическая схема регуляции активности генов, факторы транскрипции

- Транзиентное введение в клетки генетических конструкций, кодирующих малую интерферирующую РНК, к выбранной мишени
 - Анализ результатов трансфекции
 - Анализ снижения уровня трансляции выбранной мишени с использованием метода иммунофенотипирования и проточной цитометрии
 - Принцип работы проточного цитометра и сортера на его основе
 - Основные приемы детекции и анализа клеточных субпопуляций с использованием проточного цитометра

Тема 6. Стволовые клетки, механизмы репарации и регенерации органов и тканей

- Индукция адипоцитарной дифференцировки в культуре клеток 3T3-L1 преадипоцитов мыши
- Анализ результатов дифференцировки путем окрашивания культуры с помощью реагента Oil-red

Тема 7. Использование рекомбинантных ДНК для создания генно-терапевтических препаратов

- Основы генетической инженерии, клонирование фрагмента ДНК, содержащего ген флуоресцентного белка в экспрессионный вектор
- Транзиентная трансфекция полученной конструкции в клетки млекопитающих
- Анализ продукции флуоресцентного белка методом проточной цитометрии и с помощью Вестерн-блоттинга тотальных клеточных лизатов с последующей визуализацией с помощью поликлональных антител к GFP

Темы семинаров:

Тема 2. Нарушения работы генетического аппарата, коррекция мутаций

- Орфанные заболевания, их генетические модели, способы коррекции
- Животные модели орфанных заболеваний

Тема 3. Классическая схема регуляции активности генов, факторы транскрипции

- Методы изучения транскриптома и структуры хроматина

Тема 6. Стволовые клетки, механизмы репарации и регенерации органов и тканей

- Фиброз и участие клеток иммунной системы в репарации тканей

При реализации образовательных технологий используются следующие виды

самостоятельной работы:

- работа с конспектом лекции (обработка текста);
- подготовка к лекциям, семинарам и практическим занятиям;
- работа над материалом учебника;
- поиск информации по тематике занятия в сети «Интернет» и литературе;
- подготовка к контрольному опросу;
- подготовка к сдаче зачета.

Самостоятельная работа студентов состоит в проработке лекционного материала, рекомендованной литературы и Интернет-ресурсов, составление конспекта дополнительных материалов по темам, вынесенным на самостоятельное изучение, подготовке к семинарским и практическим занятиям, подготовке к зачету.

Студенты по дисциплине "Молекулярная медицина" должны самостоятельно подготовить, представить и обсудить на семинарских занятиях: доклады по материалу одной из тем, сделав акцент на том, как именно количественные и качественные изменения в ключевых для клеток молекулах приводят к возникновению патологических изменений, а также возможных способах коррекции данных нарушений с использованием низкомолекулярных соединений (ингибиторов или стимуляторов) и терапевтических генов.

Примерный перечень разделов программы, которые студенты должны изучить самостоятельно:

- Полимеразная цепная реакция
- Риски, связанные с использованием индуцированных и эмбриональных стволовых клеток

- Механизмы, влияющие на уровень и продолжительность экспрессии трансгенов
- Основные механизмы рекомбинации ДНК
- Требования к доклиническим испытаниям генотерапевтических препаратов
 - Мировой опыт применения генотерапевтических препаратов

Для аттестации по итогам освоения дисциплины "Молекулярная медицина" учебным планом предусмотрен зачет, в котором используются ниже перечисленные вопросы:

1. Нуклеотиды, структура ДНК, уотсон-криковские взаимодействия, правило Чаргаффа, основные формы ДНК. Минорные азотистые основания. Хугстиновские взаимодействия и формы ДНК, отличные от двойной спирали.
2. Организация хроматина, структура нуклеосомы, гистоны и негистоновые белки. Теломеры и центромеры.
3. Гистоновый код. Функции гистонового кода. Ремоделирование хроматина.
4. Центральная догма молекулярной биологии. Генетический код. Вариации генетического кода.
5. Ген, структура гена, функциональные элементы гена (промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы).
6. Организация мРНК, структурные элементы мРНК, открытая рамка считывания, кодоны.
7. Белковые и небелковые гены (рРНК, мяРНК, тРНК, микроРНК). РНК-белковые комплексы (примеры, функции).
8. Транскрипция, регуляция транскрипции, транскрипционные факторы, РНК-полимеразы.

9. Сплайсинг, сплайсосома, транспорт РНК в цитоплазму.
10. Рибосома, рРНК, инициация трансляции, регуляция синтеза белка на уровне трансляции.
11. тРНК: строение и функции, кодон и антикодон. Аминоацил-тРНК-синтазы.
12. Строение активного центра рибосомы, этап элонгации при трансляции. Факторы элонгации.
13. Терминация трансляции, контроль терминации трансляции. Супрессия стоп-кодонов.
14. Псевдогены и мигрирующие элементы генома (транспозоны). Механизмы возникновения и роль.
15. Репликация ДНК, ДНК-полимеразы, созревание фрагментов Оказаки
16. Рекомбинация ДНК, неаллельная рекомбинация, генетическая конверсия.
17. Виды повреждения ДНК и системы репарации ДНК. Принцип эксцизионной репарации.
18. Теломераза и обратная транскрипция. Репликация теломерных участков хромосом.
19. Методы исследования ДНК: ПЦР, клонирование, эндонуклеазы рестрикции.
20. Регуляция активности генов на уровне транскрипции и трансляции: общие принципы.
21. Редактирование генома
22. Регуляция процессов клеточной дифференцировки
23. Принципы создания генотерапевтических препаратов
24. Генотерапевтические векторы

Основная литература

1. Animal Models of Cardiovascular Disease
<http://www.revespcardiol.org/en/animal-models-of-cardiovascular-disease/articulo/13131649/>
2. Anthony Atala, Robert Lanza, James A. Thomson and Robert M. Nerem. Principles of Regenerative Medicine». N.Y. Elsevier, 2008, 554 p.
3. Cohen-Haguenuer O. Gene Therapy: Regulatory Issues and International Approaches to Regulation // Curr. Option in Biotechnol. 1997. Vol. 8. P. 361-369.
4. Culver K.W. Gene Therapy: A Handbook for Physicians. N.Y.: May Ann Liebert Inc. Publ., 1994. 117 p.
5. Experimental Design and Statistics in Biomedical Research. ILAR Journal, V.43(4), 2002.
6. Harris I. Variables in Animal Based Research: Part 1. Phenotypic Variability in Experimental animal. ANZCCART News. 1997, V.10, No 3, 1-8.
7. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рефф М., Робертс К, Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки.- М., 1994.
8. Гистология. Под ред. В.Г. Елисеева, Ю.И. Афанасьева. – М. Медицина, 1983.
9. Гуськова. Т.А. Токсикология лекарственных средств. Изд. 2-ое дополненное. М.: МДВ, 2008. 154 с.
10. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. - М.: Изд-во ВПК, 2004. – 608 с.
11. Принципы надлежащей лабораторной практики. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009. Москва: Стандартиформ, 2010.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

13. Угрюмов М.В. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма ISBN:978-5-91522-401-7; 2014 г.
14. Фрешни Р. Культура животных клеток. Бином. Лаборатория знаний, 2014
15. Хэм А., Кормак Д. Гистология (в 5 томах). – М. Мир, 1982
16. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. – М. ИКЦ «Академкнига», 2004.
17. Ченцов Ю.С. Цитология с элементами клеточной патологии. – М. Медицинское информационное агентство, 2010.
18. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология, “МАИК”, 2002

Дополнительная литература

1. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н., Горячкина В.Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. – М. Медицинское информационное агентство, 2002.
2. Микроскопическая техника: Руководство. Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л.Перова. – М. Медицина, 1996.
3. Шубникова Е.А. Лекции по гистологии. – М. Издательство Московского Университета, 1974.
4. Юшканцева С.А., Быков В.Л. Гистология, цитология и эмбриология. Краткий атлас. – СПб. Издательство «П-2», 2006.
5. Биология стволовых клеток и клеточные технологии в 2 т. Под ред. М.А. Пальцева. – М. «Шико», 2009.
6. Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения. – М. «Литтерра», 2009.
7. Stem Cell Transplantation. Ho A.D., Hoffman R., Zanjani E.D. 2006, Wiley-VCH.
8. Nanotechnology in Biology and Medicine: Methods, Devices, Applications

9. Fundamentals of Molecular Diagnostics, D.E. Burns
10. Molecular diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications

Интернет ресурсы:

- a. www.pubmed.com
- b. www.genetherapynet.com
- c. www.clinicaltrials.gov
- d. www.asgct.org
- e. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- a. <http://www.researchgate.net/>
- b. <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>