

**Міністерство освіти і науки України
Дніпропетровський національний університет
ім. Олеся Гончара**

Г.О. Ушакова, А.О. Тихомиров, В.С. Недзвецький

**ВИВЧЕННЯ МЕТОДІВ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ
У ФІЗІОЛОГІЇ, БІОХІМІЇ ТА МІКРОБІОЛОГІЇ**

*Ухвалено вченою радою університету
як навчальний посібник*

**Дніпропетровськ
РВВ ДНУ
2010**

ББК 616
У 93

Рецензент: д-р біол. наук, проф. О.В. Севериновська
д-р біол. наук, проф. А.І. Шевцова

У 93 Ушакова, Г.О. Вивчення методів наукових досліджень у фізіології, біохімії та мікробіології [Текст]: навч. посіб/ Г.О. Ушакова, А.О. Тихомиров, В.С. Недзвецький. – Д.: РВВ ДНУ, 2010. – 68 с.

Наведені основні положення про організацію та шляхи забезпечення наукових досліджень, сучасні фізико-хімічні методи в біології. Наданий матеріал дає можливість сформулювати вміння студентів ставити перед собою завдання для здійснення наукового пошуку, а також організацію, постановку та проведення науково-дослідної роботи.

Для студентів факультету біології, екології та медицини ДНУ. Може бути корисним для студентів природничих факультетів.

Темплан 2010, поз. 54

ВСТУП

Головною метою даного навчального посібника є висвітлення основних положень про закономірності розвитку науки, організацію та шляхи забезпечення наукових досліджень, сучасні фізико-хімічні методи в біології, що розглядаються у нормативній дисципліні “Методи наукових досліджень” за напрямком 0704-Біологія.

Завданнями цього курсу є:

- **методичні** (забезпечення підготовки майбутніх біологів, біохіміків, мікробіологів до проведення наукових досліджень на високому методологічному рівні, що дозволять вирішувати проблеми сучасної біології об'єктивно, з належним науковим обґрунтуванням);
- **пізнавальні** (формування знань й застосування методів наукового пізнання для проведення науково-дослідної роботи);
- **практичні** (формування вміння студентів ставити перед собою завдання, для виконання яких потрібний науковий пошук, а також організувати та провести науково-дослідну роботу).

Наука є форма суспільної свідомості, основу якої становить система знань про об'єктивну реальність. **Наукова діяльність** – це процес пізнання закономірностей об'єктивного світу, процес створення знань та їх застосування. Термін "наука" вживають також для позначення окремих галузей наукового знання. У цьому розумінні наука – сфера людської діяльності, функцією якої є вироблення систематизованих знань про певну частину об'єктивної реальності, що складає її об'єкт і предмет. Наприклад: наука біологія, наука біохімія, наука мікробіологія.

Безпосередньою метою науки є вивчення, пояснення і передбачення процесів і явищ дійсності, які являють собою предмет її дослідження. Наука вивчає різні рівні системи організації й форми руху матерії з погляду пізнання істотних властивостей явищ, встановлення їх законів, різних причинних залежностей і взаємодій з метою управління природними й соціальними процесами, передбачення характеру і напрямку їх перебігу, створення нових технологій і розвитку виробництва.

Завданнями науки є:

1. Відкриття, накопичення фактів.
2. Систематизація фактів і знаходження закономірностей.
3. Пояснення фактів.
4. Передбачення нових фактів і явищ.

Але є ще одна характеристика науки, яка вказує на істинність чи хибність наукових знань – це практика.

Кожна наука має свій об'єкт і предмет дослідження.

Об'єкт – це частина об'єктивної реальності, яка вивчається наукою.

Предмет – це частина, сторона об'єкта або "кут зору", під яким вивчається об'єкт.

Для того щоб зрозуміти різницю між об'єктом та предметом дослідження, зіставимо науки, які мають один об'єкт але різні предмети.

Наприклад: Психологія, фізіологія, анатомія людини. Об'єкт спільний – людина. Предмет психології – психічні процеси. Предмет фізіології – фізіологічні процеси. Предмет анатомії – будова тіла.

Формами існування наукових знань про навколишню дійсність є основні елементи людського мислення: факти, поняття, аксіоми, гіпотези, закономірності, закони, теорії, концепції, що детально розглядалися й розглядаються філософами всіх часів.

У даному навчальному посібнику ми розглянемо методологічні основи наукового дослідження, базові рекомендації щодо його проведення та аналізу отриманих даних, а також найбільш поширені сучасні фізико-хімічні методи, що застосовуються в наукового-дослідних та виробничих закладах біолого-медичного напрямку. Викладена нижче інформація допоможе студентам-біологам зробити упевнені кроки у своїх перших наукових дослідженнях.

ТЕМА 1. МЕТОДОЛОГІЧНІ ОСНОВИ НАУКОВОГО ПІЗНАННЯ

Загальні відомості про наукове пізнання

Наукове пізнання – це цілісна система, що розвивається, включає численність елементів наукового пізнання та їх відносин. Структура наукового пізнання складається з об'єкта (предмета пізнання), суб'єкта пізнання, засобів, заходів і форм пізнання. Усі елементи структури – класичний варіант будь-якого гносеологічного процесу, але не вичерпують усього багатства компонентів. Найважливішими складовими частинами наукового пізнання виступають також фактичний матеріал емпіричного дослідження, результати узагальнення в абстракціях (поняттях, судженнях, умовиводах та ін.), гіпотетичні положення, філософські настанови, соціокультурні підстави, методи, ідеали й норми наукового пізнання, стиль пізнання та ін.

Наукове знання і процес його здобуття характеризуються системністю і структурованістю. У структурі наукового знання виділяють **емпіричний** (дослідний) і **теоретичний рівні**. Сукупність дослідних заходів і методів забезпечують емпіричний і теоретичний етапи наукового дослідження.

На **емпіричному рівні** дослідний об'єкт відображається здебільшого з позицій зовнішніх зв'язків і відносин. Емпіричному пізнанню притаманні збір фактів, первинне узагальнення, опис дослідних даних, систематизація і класифікація. Емпіричне дослідження спрямоване безпосередньо на об'єкт дослідження, відбувається на основі порівняння, вимірювання, спостереження, експерименту, аналізу та ін. Під емпіричним дослідженням розуміють також практичні аспекти наукової організації, збір емпіричної інформації, осмислення результатів спостереження й експериментів, відкриття емпіричних законів, формування класифікацій (розбивка класу об'єктів на підкласи) та ін. Отже, емпіричне дослідження — це особливий вид практичної діяльності, що існує всередині науки. Така діяльність потребує наявності специфічних здібностей: майстерності експериментатора, спостережливості польового дослідника, особистої думки людей, які займаються проведенням досліджень та ін. Було б помилкою вважати, що емпіричне дослідження відбувається без впливу теорії.

Важливо глибоко розуміти, що вихідним пунктом сучасної науки служать не факти самі по собі, а теоретичні схеми, концептуальні каркаси дійсності, тобто різного роду постулати, концептуальні моделі, аксіоми, принципи та ін. Кожен крок експеримента становить дію, що планується і спрямовується теорією.

Теоретичний рівень пізнання характеризується домінуванням понять, теорій, законів, принципів, наукових узагальнень і висновків. Теоретичне пізнання відображає предмети, властивості та відношення з боку універсальних внутрішніх, істотних зв'язків і закономірностей, досягнутих раціональною обробкою емпіричних даних. Відбувається така обробка на основі форм мислення: поняття, судження, умовиводу, закону, категорії та ін. Головна мета теоретичного пізнання – збагнення об'єктивної істини, вільної від спотворення і суб'єктивності, пояснення й інтерпретація емпіричних фактів. Теорія оперує ідеалізованими об'єктами (ідеальний газ, абсолютно тверде тіло, ідеальний тип, матеріальна точка та ін.), тому теорія користується аксіоматичним методом, гіпотетико-дедуктивним, системно-структурним, структурно-функціональним аналізом, еволюційним, редукціоністським, методом підймання від абстрактного до конкретного. Емпіричне і теоретичне – різні рівні пізнання. Емпіричні й теоретичні знання розрізняються за засобами ідеального відтворення об'єктивної реальності, гносеологічної спрямованості, характером і типом здобуття знання, за методами, що застосовуються під час пізнання. І все ж жорсткої межі між емпіричним і теоретичним не існує. Емпіричне пізнання, досліджуючи властивості й відношення речей, здобуває нове знання, що стимулює подальший розвиток теорії. Теоретичне дослідження шукає ствердження правильності результатів в емпіричному. Дослід, експеримент завжди теоретично навантажені, теорія потребує емпіричної інтерпретації.

Методи емпіричного дослідження

Розрізняють наукові методи, до яких вдаються на емпіричному рівні пізнання, і методи теоретичного осмислення дійсності. Методи емпіричного рівня пізнання (вимірювання, порівняння, спостереження, експеримент) дають можливість накопичити емпіричні дані, факти, аналіз яких забезпечує формування понятійного знання.

Спостереження — це упорядкована, систематизована, цілеспрямована система сприйняття досліджуваних явищ, їх властивостей, зв'язків, відношень, яка постачає вихідний емпіричний матеріал для їх пізнання. Будь-що стає науковим фактом за умови, що воно зафіксоване тим чи іншим прийнятим у даній науці способом — у вигляді протокольного чи магнітофонного запису, фотографії тощо. Спостереження широко застосовуються в багатьох природничих та суспільних науках. У сучасній науці в процесі спостереження дедалі частіше використовують різноманітні прилади, які ніби доповнюють органи чуття людини, розширюють можливості сприймання, — мікроскоп, телескоп та ін. На відміну від спостережень, які наявні у повсякденному житті, наукове спостереження завжди пов'язане з виконанням відповідного теоретичного завдання, перевіркою певної гіпотези тощо.

Експеримент, перебуваючи в тісному зв'язку із спостереженням, відрізняється від останнього тим, що експериментатор активно втручається в перебіг досліджуваних явищ та подій. Він вдається до експерименту тоді, коли для вирішення проблеми доводиться вдаватися до певної форми взаємодії з досліджуваним предметом, до створення штучного середовища з метою одержання відповідних емпіричних даних. Свідомо і плановірно підбираючи умови, у яких відбувається досліджуване явище чи протікає процес, регулюючи, багатократно повторюючи його, вчений виявляє в ньому істотне й абстрагується від неістотного. Експеримент застосовують не лише для одержання емпіричних даних. Іноді до нього вдаються і тоді, коли виникає потреба підтвердити або спростувати певні наслідки, що випливають з існуючої теорії. Експеримент дає загалом багатшу і повнішу інформацію про досліджувані явища порівняно із спостереженням. Правда, при цьому виникає можливість привнесення суб'єктивного начала в пізнавальний процес, перекрученого відображення дійсності. Крім названих до методів емпіричного рівня відносять ще порівняння, вимірювання, метод спроб і помилок та ін.

Порівняння — метод емпіричного рівня наукового пізнання, з допомогою якого робиться висновок про подібність чи відмінність об'єктів пізнання. Цей метод дає можливість виявити кількісні й якісні характеристики предметів, класифікувати, упорядкувати й оцінити їх.

Вимірювання — метод емпіричного рівня пізнання, за допомогою якого визначається відношення однієї вимірюваної величини, до іншої, що приймається за постійну стосовно вимірюваної. Метод вимірювання включає такі основні моменти: вибір одиниці вимірювання й одержання набору відповідних мір, установлення правил порівняння вимірюваної величини з мірою і правил складання мір, опис процедури вимірювання.

Методи теоретичного дослідження

Здобутий за допомогою емпіричних методів пізнання матеріал, факти обробляються, результатом чого є справжнє теоретичне знання. При цьому вдаються до теоретичних методів пізнання — абстрагування й узагальнення, аналізу і синтезу, індукції та дедукції й інших методів продукування понятійного знання.

Абстрагування — це метод, за допомогою якого в думках відволікаються від неістотних властивостей явищ, що вивчаються. Результатом абстрагування є поняття, в яких відображаються загальні та суттєві ознаки предметів і явищ об'єктивної дійсності.

Узагальнення — це уявний перехід від окремих фактів, подій до їх ототожнення або від однієї думки до іншої, що є більш загальною. Ці переходи відбуваються на підставі особливих правил. Узагальнення перебуває в органічному взаємозв'язку з абстрагуванням, аналізом, синтезом, порівнянням тощо.

Аналіз — це уявне розчленування предмета (явища, процесу), властивості предмета або відношення між предметами на частини. Процедура аналізу є

органічною складовою частиною будь-якого наукового дослідження. Вона, як правило, становить початкову стадію вивчення об'єкта, на якій дослідник переходить від нерозчленованого опису цього об'єкта до виявлення його структури, складників, а також властивостей.

Синтез — уявне поєднання різноманітних елементів, сторін предмета в єдине ціле (систему). Синтез є наступним етапом пізнання після аналізу. Синтез має багато різних форм. Так, будь-який процес утворення понять ґрунтується на діалектичному взаємозв'язку аналізу і синтезу. Аналізуються, а потім синтезуються та узагальнюються і емпіричні дані в процесі наукового дослідження. У теоретичному науковому знанні синтез виступає у формі взаємозв'язку теорій, що належать до однієї предметної сфери. Для сучасної науки характерні процеси синтезу не лише всередині окремих наукових дисциплін, але й між різними дисциплінами — міждисциплінарні. Так, процеси синтезу відіграли суттєву роль у процесі формування біофізики, біохімії тощо.

Індукція — метод пізнання, за допомогою якого на підставі знання властивостей, зв'язків чи відношень окремих предметів роблять висновок про наявність цих властивостей (зв'язків чи відношень) усіх предметів чи явищ відповідної предметної сфери. Об'єктивною основою індукції служать закономірності об'єктивного світу, а суб'єктивною — пізнаваність цих закономірностей з допомогою логічних чи статистичних схем цього виду умовиводів. Логічні схеми, що застосовуються в припущенні, вказують на те, що осмислюванні явища не є випадковими, а статистичні — ґрунтуються на припущенні про випадковість цих явищ. Історично першим видом міркувань за індуктивною схемою була індукція, що ґрунтувалася на факті простого повторювання зв'язків між явищами. Це так звана популярна (народна) індукція. Вона виникає в ситуації, коли в окремих випадках вбачається певна регулярність, зокрема у формі повторюваності явищ, процесів, подій, що дає можливість сформулювати цілу низку одиничних суджень, у яких узагальнюється ця регулярність. За умови відсутності суперечливих випадків ця сукупність одиничних суджень розглядається як підстава для загального висновку. Індукція поділяється на повну і неповну. Індукція, у якій висновок про всю множину предметів роблять на підставі знання кожного елемента цієї множини, називається повною. Повна індукція дає достовірні висновки. Так, знаючи, що Земля обертається навколо Сонця, Марс обертається навколо Сонця, Венера обертається навколо Сонця тощо, на основі знання дев'яти одиничних суджень, суб'єктами яких виступають поняття, що позначаються відповідними іменами (назвами планет сонячної системи), робиться висновок за повною індукцією: "Отже, всі планети сонячної системи обертаються навколо Сонця". Індукція, завдяки якій на основі знання лише деяких елементів множини предметів роблять висновок про всю множину, називається неповною. Неповну індукцію називають науковою лише за умови, що крім формального дається і реальне обґрунтування її висновків шляхом доведення їх невідповідності, насамперед з допомогою виявлення причинно-наслідкових зв'язків між явищами, що досліджуються. Загалом же неповна індукція дає ймовірні висновки, які свідчать про необхідність

діалектичного зв'язку між індукцією і дедукцією. Значний вклад у розвиток індуктивного методу належить перш за все Ф. Бекону і Дж.С. Міллю.

Дедукція — метод наукового пізнання, за допомогою якого, виходячи з більш загальних положень, одержують менш загальні, часткові, а то й одиничні. Завдяки дедукції одержують достовірне знання, тому дедуктивними часто називають необхідні умовиводи. Творцем дедуктивного методу вважають Аристотеля. Ф. Бекон та Дж.С. Міль негативно ставилися як до дедуктивного умовиводу, вважаючи його другорядним методом, так і загалом до дедукції. Сучасна наука враховує діалектичний взаємозв'язок індукції та дедукції.

Аналогія — метод, відповідно до якого на підставі подібності предметів за одними ознаками робиться висновок про їх подібність за іншими ознаками. Аналогія, як і неповна індукція, сама по собі ще не може гарантувати достовірні висновки.

Моделювання — метод дослідження об'єктів на їх моделях. Побудова моделей предметів і явищ здійснюється з метою їх досконалішого вивчення, раціоналізації способів їх побудови, впливу на них тощо. Форми моделей різноманітні і залежать від багатьох обставин, зокрема від сфери їх застосування. Так, за характером моделей розрізняють предметне і знакове (інформаційне) моделювання. Моделювання завжди застосовується разом з іншими методами, особливо в тісному зв'язку воно перебуває з експериментом. Моделювання завжди передбачає використання методів абстрагування та ідеалізації. Воно дедалі глибше проникає в практичну діяльність людей, оскільки становить собою не лише метод пізнання, але й критерій перевірки наукових знань.

Формалізація — метод, з допомогою якого змістовне знання відображається у формалізованій мові. Необхідною умовою для побудови такої мови є використання аксіоматичного методу, завдяки якому вдається одержати всі твердження теорії з невеликої кількості положень (аксіом), які приймаються без доведення. Формалізація доведень дає можливість звільнитися від звертання до інтуїтивних засобів, що має вирішальне значення для строгості обґрунтувань. Формалізація є необхідною умовою побудови штучних (формалізованих) мов. Одержані з допомогою формалізації результати мають важливе філософське значення, зокрема для розв'язання проблеми співвідношення формальних і змістових компонентів у науковому знанні. Формалізація є засобом виявлення і уточнення змісту наукового знання. Водночас необхідно зазначити, що будь-яка формалізація не може вичерпати все багатство змісту знань.

Основи системного аналізу

Системний аналіз — вивчення об'єкта дослідження як сукупності елементів, що утворюють систему. У наукових дослідженнях він передбачає оцінку поведінки об'єкта як системи з усіма факторами, які впливають на його функціонування.

Існують такі основні типи ресурсів у природі й у суспільстві:

речовина – найбільш досконало вивчений ресурс, що в основному представлений таблицею Д.І. Менделєєва досить повно й поповнюється не так часто; є відображенням сталості матерії в природі, як міра однорідності матерії;

енергія – не повністю вивчений тип ресурсів, наприклад, ми не володіємо керованою термоядерною реакцією; є відображенням мінливості матерії, переходів з одного виду в інший, як міра необоротності матерії;

інформація – мало вивчений тип ресурсів, є відображенням порядку, структурованості матерії, як міра порядку, самоорганізації матерії (і соціуму), зараз цим поняттям ми позначаємо деякі повідомлення;

людина – є носієм інтелекту вищого рівня і є в економічному, соціальному, гуманітарному значеннях найважливішим і унікальним ресурсом суспільства, розглядається як міра розуму, інтелекту й цілеспрямованої дії, міра соціального початку, вищої форми відображення матерії (свідомості);

організація (або організованість) – є формою ресурсів у соціумі, групі, що визначає його структуру, включаючи інститути людського суспільства, його надбудови, застосовується як міра впорядкованості ресурсів. Організація системи пов'язана з наявністю деяких причинно-наслідкових зв'язків у цій системі. Організація системи може мати різні форми, наприклад, біологічну, інформаційну, екологічну, економічну, соціальну, часову, просторову, і вона визначається причинно-наслідковими зв'язками в матерії й соціумі;

простір – міра довжини матерії, розподілу її у навколишньому середовищі;

час – міра оборотності (необоротності) матерії, подій. Час нерозривно пов'язаний зі змінами дійсності.

Можна говорити про різні поля, у яких "поміщена" людина, – матеріальне, енергетичне, інформаційне, соціальне, про їх просторові, ресурсні (матерія, енергія, інформація) і часові характеристики. Усі типи ресурсів тісно пов'язані й сплетені. Більше того, вони неможливі один без одного, актуалізація одного з них веде до актуалізації іншого.

Система – об'єкт або процес, у якому елементи–учасники пов'язані деякими зв'язками й відносинами.

Підсистема – частина системи з деякими зв'язками й відносинами.

Будь-яка система складається з підсистем, підсистема будь-якої системи може бути сама розглянута як система. Межі розглянутої системи визначаються доступними ресурсами й оточенням.

Основні ознаки системи:

- цілісність, зв'язність або відносна незалежність від середовища та систем (найбільш істотна кількісна характеристика системи). Зі зникненням зв'язності зникає й система, хоча елементи системи й навіть деякі відносини між ними можуть зберігатися;
- наявність підсистем і зв'язків між ними або наявність структури системи (найбільш істотна якісна характеристика системи). Зі зникненням підсистем або зв'язків між ними може зникнути й сама система;

- можливість відокремлення або абстрагування від навколишнього середовища, тобто відносна відособленість від тих факторів середовища, які не впливають достатньо на досягнення мети;
- зв'язки з навколишнім середовищем з обміну ресурсами;
- підпорядкованість усієї організації системи деякій меті (як це, утім, впливає з визначення системи);
- емерджентність, або незвідність властивостей системи до властивостей елементів.

Ціле завжди є система, а цілісність завжди властива системі, проявляючись у системі у вигляді симетрії, повторюваності (циклічності), адаптованості й саморегуляції, наявності й збереженні інваріантів.

Класифікацію систем можна здійснити за різними критеріями. Проводити її жорстко неможливо – вона залежить від мети й ресурсів. Наведемо основні способи класифікації (можливі й інші критерії класифікації систем).

1. За відношенням системи до навколишнього середовища:
 - відкриті (є обмін ресурсами з навколишнім середовищем);
 - закриті (немає обміну ресурсами з навколишнім середовищем).
2. За походженням системи (елементів, зв'язків, підсистем):
 - штучні (знаряддя, механізми, машини, автомати, роботи тощо);
 - природні (живі, неживі, екологічні, соціальні тощо);
 - віртуальні (уявлені й, хоча реально не існують, але функціонують так само, як і у випадку, якби вони існували);
 - змішані (економічні, біотехнічні, організаційні тощо).
3. За описом змінних системи:
 - з якісними змінними (мають лише змістовний опис);
 - з кількісними змінними (мають дискретно або безупинно описувані кількісним чином змінні);
 - змішаного (кількісно-якісне) описування.
4. За типом описування закону (законів) функціонування системи:
 - типу "Чорний ящик" (невідомий повністю закон функціонування системи; відомі тільки вхідні й вихідні повідомлення);
 - не параметризовані (закон не описаний; описуємо за допомогою хоча б невідомих параметрів; відомі лише деякі апріорні властивості закону);
 - параметризовані (закон відомий з точністю до параметрів і його можливо віднести до деякого класу залежностей);
 - типу "Білий (прозорий) ящик" (повністю відомий закон).
5. За способом керування системою (у системі):
 - керовані ззовні системи (без зворотного зв'язку, регульовані, керовані структурно, інформаційно або функціонально);
 - керовані зсередини (самокеровані або саморегульовані – програмно керовані, регульовані автоматично, адаптивні, – які пристосовуються із допомогою керованих змін станів, і що самоорганізуються – змінюють у часі й просторі свою структуру найбільш оптимально, що впорядковують свою структуру під впливом внутрішніх і зовнішніх факторів);

– з комбінованим керуванням (автоматичні, напіваавтоматичні, автоматизовані, організаційні).

Під час системного аналізу об'єктів, процесів, явищ необхідно пройти (у зазначеному порядку) такі етапи системного аналізу:

1. Виявлення проблеми.
2. Оцінка актуальності проблеми.
3. Формулювання цілей, їх пріоритетів і проблем дослідження.
4. Визначення й уточнення ресурсів дослідження.
5. Виділення системи (з навколишнього середовища) за допомогою ресурсів.
6. Опис підсистем (розкриття їх структури), їх цілісності (зв'язків), елементів (розкриття структури системи), аналіз взаємозв'язків підсистем.
7. Побудова (опис, формалізація) структури системи.
8. Установлення (опис, формалізація) функцій системи та її підсистем.
9. Узгодження цілей системи із цілями підсистем.
10. Аналіз (випробування) цілісності системи.
11. Аналіз і оцінка непередбаченості системи.
12. Випробування, верифікація системи (системної моделі), її функціонування.
13. Аналіз зворотних зв'язків у результаті випробувань системи.
14. Уточнення, коректування результатів попередніх пунктів.

Моделі у науковому дослідженні

Слово "модель" (лат. modelium) означає "міра", "спосіб", "подібність із якоюсь річчю". Модель і моделювання – універсальні поняття, атрибути одного з найбільш потужних методів пізнання в будь-якій професійній області, пізнання системи, процесу, явища.

Моделі й моделювання поєднують фахівців різних областей, що працюють над вирішенням міжпредметних проблем, незалежно від того, де ця модель і результати моделювання будуть застосовані. Вид моделі й методи її дослідження більше залежать від інформаційно-логічних зв'язків елементів і підсистем системи, що моделюється, ресурсів, зв'язків з оточенням, використовуваних у ході моделювання, а не від конкретної природи, конкретного наповнення системи. У моделей, особливо математичних, є й дидактичні аспекти – розвиток модельного стилю мислення, що дозволяє вникати в структуру й внутрішню логіку модельованої системи.

Побудова моделі – системне завдання, що вимагає аналізу й синтезу початкових даних, гіпотез, теорій, знань фахівців. Системний підхід дозволяє не тільки побудувати модель реальної системи, але й використати цю модель для оцінки (наприклад, ефективності керування, функціонування) системи.

Модель – об'єкт або опис об'єкта, системи для заміщення (за певних умов пропозицій, гіпотез) однієї системи (тобто оригіналу) іншою системою для кращого вивчення оригіналу або відтворення яких-небудь його властивостей. Модель – результат відображення однієї структури (вивченої) на іншу (маловивчену). Екстраполюючи фізичну систему (об'єкт) на математичну систему (наприклад, математичний апарат рівнянь), одержимо фізико-математичну модель

системи або математичну модель фізичної системи. Будь-яка модель будується й досліджується за певних допущень, гіпотез.

Приклад. Фізіологічна система – система кровообігу людини – підкоряється деяким законам термодинаміки. Описуючи цю систему фізичною (термодинамічною) мовою балансових законів, одержимо фізичну, термодинамічну модель фізіологічної системи. Якщо записати ці закони математичною мовою, наприклад, виписати відповідні термодинамічні рівняння, то вже одержимо математичну модель системи кровообігу. Назвемо її фізіолого-фізико-математичною моделлю, або фізико-математичною моделлю.

Моделювання ґрунтуються на теорії подоби, відповідно до якої абсолютна подоба може мати місце лише у разі заміни одного об'єкта іншим аналогічним. Під час моделювання більшості систем (за винятком, можливо, моделювання одних математичних структур іншими) абсолютна подібність неможлива, і основна мета моделювання – досить повне відображення функціонування модельованої системи.

Моделі, якщо відволіктися від сфер їх застосування, бувають трьох типів: пізнавальні, прагматичні й інструментальні.

Пізнавальна модель – форма організації й подання знань, засіб з'єднання нових і старих знань. Пізнавальна модель, як правило, підганяється під реальність і є теоретичною моделлю.

Прагматична модель – засіб організації практичних дій, робочого подання цілей системи для її керування. Реальність у них підганяється під деяку прагматичну модель. Це, як правило, прикладні моделі.

Інструментальна модель – засіб побудови, дослідження й/або використання прагматичних і/або пізнавальних моделей. Пізнавальні відбивають існуючі, а прагматичні – хоч і не існуючі, але бажані й, можливо, здійсненні відносини й зв'язки.

За рівнем, "глибиною" моделювання моделі бувають:

- а) емпіричні – на основі емпіричних фактів, залежностей;
- б) теоретичні – на основі математичних описів;
- в) змішані, напівемпіричні – на основі емпіричних залежностей і математичних описів.

Проблема моделювання складається із трьох завдань:

- побудова моделі (ця задача менш формалізована й конструктивна, у тому розумінні, що немає алгоритму для побудови моделей);
- дослідження моделі (це завдання більше формалізоване, є методи дослідження різних класів моделей);
- застосування моделі (конструктивне й конкретизоване завдання).

Моделювання – це універсальний метод одержання, опису й використання знань. Він застосовується в будь-якій професійній діяльності. У сучасній науці й технології роль і значення моделювання підсилюється, актуалізується проблемами, успіхами інших наук. Моделювання реальних і нелінійних систем живої й неживої природи дозволяє перекидати містки між нашими знаннями й реальними системами, процесами, у тому числі й розумовими.

Основними властивостями будь-якої моделі є:

- цілеспрямованість** – модель завжди відображає деяку систему, тобто має мету;
- скінченність** – модель відображає оригінал лише в кінцевому числі його відносин і, крім того, ресурси моделювання не безмежні;
- спрощеність** – модель відображає тільки істотні сторони об'єкта й, крім того, повинна бути простою для дослідження або відтворення;
- приблизність** – дійсність відображається моделлю грубо або приблизно;
- адекватність** – модель повинна успішно описувати модельовану систему;
- наочність**, **видимість** основних її властивостей і відносин;
- доступність** і **технологічність** для дослідження або відтворення;
- інформативність** – модель повинна містити достатню інформацію про систему (у рамках гіпотез, прийнятих у ході побудови моделі) і повинна давати можливість одержати нову інформацію;
- збереження інформації**, що містилася в оригіналі (з точністю розглянутих під час побудови моделі гіпотез);
- повнота** – у моделі повинні бути враховані всі основні зв'язки й відносини, необхідні для забезпечення мети моделювання;
- стійкість** – модель повинна описувати й забезпечувати стійку поведінку системи, якщо навіть вона спочатку є нестійкою;
- цілісність** – модель реалізує деяку систему (тобто ціле);
- замкнутість** – модель ураховує й відображає замкнуту систему необхідних основних гіпотез, зв'язків і відносин;
- адаптивність** – модель може бути пристосована до різних вхідних параметрів, впливів оточення;
- керованість** (імітаційність) – модель повинна мати хоча б один параметр, змінами якого можна імітувати поведінку модельованої системи в різних умовах;
- еволюційність** – можливість розвитку моделей (попереднього рівня).

Життєвий цикл модельованої системи:

- збір інформації про об'єкт, висування гіпотез, передмодельний аналіз;
- проектування структури й складу моделей (підмоделей);
- побудова специфікацій моделі, розробка й налагодження окремих підмоделей, складання моделі в цілому, ідентифікація (якщо це потрібно) параметрів моделей;
- дослідження моделі – вибір методу дослідження й розробка алгоритму (програми) моделювання;
- дослідження адекватності, стійкості, чутливості моделі;
- оцінка засобів моделювання (витрачених ресурсів);
- інтерпретація, аналіз результатів моделювання й установлення деяких причинно-наслідкових зв'язків у досліджуваній системі;
- генерація звітів і проектних (народно-господарських) рішень;
- уточнення, модифікація моделі, якщо це необхідно, і повернення до досліджуваної системи з новими знаннями, отриманими за допомогою моделі й моделювання.

Моделювання – метод системного аналізу. Але часто в системному аналізі у ході модельного підходу дослідження може відбуватися одна методична помилка, а саме, побудова коректних і адекватних моделей (підмоделей) підсистем системи і їх логічно коректне вв'язування не дає гарантій достовірності побудованої таким способом моделі всієї системи. Модель, побудована без урахування зв'язків системи із середовищем і її поведінки стосовно цього середовища, може часто лише служити ще одним підтвердженням теореми Геделя, а точніше, її наслідку, який стверджує, що в складній ізольованій системі можуть існувати істини й висновки, коректні в цій системі й некоректні поза нею.

Моделювання (у значенні "метод", "модельний експеримент") розглядається як особлива форма експерименту, експерименту не над самим оригіналом (це називається простим або звичайним експериментом), а над копією (заступником) оригіналу. Тут важливий ізоморфізм систем (оригінальної і модельної) – ізоморфізм, як самої копії, так і знань, за допомогою яких вона була запропонована.

Моделі й моделювання застосовуються за такими основними напрямками:

- навчання (як моделям так й моделюванню);
- пізнання й розробка теорії досліджуваних систем (за допомогою яких-небудь моделей, моделювання, результатів моделювання);
- прогнозування (вихідних даних, ситуацій, станів системи);
- керування (системою в цілому, окремими підсистемами системи), вироблення управлінських рішень і стратегій;
- автоматизація (системи або окремих підсистем системи).

ТЕМА 2. ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ПРОВЕДЕННЯ НАУКОВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Як вказувалося вище, наукове дослідження – це діяльність, спрямована на всебічне вивчення об'єкта або явища, їх структури та зв'язків, а також одержання та впровадження у практику корисних для людини результатів. Його об'єктом є матеріальна система (наприклад, будь-який біооб'єкт), а предметом – структура системи, взаємодія її елементів, різні властивості, закономірності розвитку тощо.

Наукові дослідження поділяють за цільовим призначенням на фундаментальні, прикладні, пошукові та розробки. **Фундаментальні наукові дослідження** – це експериментальна або теоретична діяльність, спрямована на одержання нових знань про основні закономірності будови, функціонування та розвитку біосистеми або об'єкта (наприклад, хромосомна теорія Морганна). **Прикладні наукові дослідження** – це дослідження, спрямовані на застосування нових знань для досягнення практичних цілей та вирішення конкретних проблем. Тобто вони спрямовані на вирішення проблем використання наукових знань, отриманих у ході фундаментальних досліджень, у практичній діяльності людей (наприклад, розробка та застосування методів молекулярної гібридизації нуклеїнових кислот, ПЛР-аналіз, клонування тощо). **Пошуковими** називають наукові дослідження, спрямовані на визначення перспективності роботи над

темою, пошук шляхів вирішення наукових задач. **Розробкою** називають дослідження, спрямоване на впровадження у практику конкретних фундаментальних та прикладних досліджень.

За тривалістю наукові дослідження можна розділити на довготривалі, короткотривалі та експрес-дослідження. Залежно від форм та методів дослідження виділяють експериментальне, методичне, описове, експериментально-аналітичне, історико-біографічне та дослідження змішаного типу.

Теоретичний рівень дослідження характеризується превалюванням логічних методів пізнання. На цьому рівні отримані факти досліджуються, обробляються за допомогою логічних понять, умовиводів, законів тощо. Структурними компонентами теоретичного пізнання є проблема, гіпотеза та теорія.

Проблема – це складне теоретичне або практичне питання, способи вирішення якого невідомі або відомі не повністю.

Гіпотеза є припущення про структуру досліджуваних об'єктів і характер внутрішніх та зовнішніх структурних елементів, які потребують перевірки та доведення. Наукова гіпотеза має відповідати таким вимогам:

- 1) релевантність, тобто відношенню до фактів, на які вона спирається;
- 2) перевірка дослідним шляхом та співвідношення з даними спостереження або експерименту;
- 3) сумісність з існуючим науковим знанням;
- 4) володіння пояснювальною силою, тобто з гіпотези має виводитися певна кількість фактів, що її підтверджують;
- 5) простота: вона не повинна містити жодних довільних допущень, суб'єктивних нашарувань.

Розрізняють гіпотези описові, пояснювальні та прогнозіві. **Описова гіпотеза** – це припущення про істотні властивості об'єктів, характер зв'язків між окремими елементами досліджуваного об'єкта. **Пояснювальна гіпотеза** – це припущення про причинно-наслідкові залежності. **Прогнозова гіпотеза** – це припущення щодо тенденцій та закономірностей розвитку об'єкта дослідження.

Теорія – це логічно організоване знання, концептуальна система знань, яка адекватно та цілісно відбиває певну область дійсності. Вона має такі властивості:

- 1) теорія являє собою одну з форм раціональної розумової діяльності;
- 2) теорія – це цілісна система достовірних знань;
- 3) теорія не лише описує сукупність фактів, але й пояснює їх, тобто виявляє походження та розвиток явищ та процесів, їх внутрішні та зовнішні зв'язки, причинні та інші залежності тощо;
- 4) усі положення та висновки, що містяться у теорії, обґрунтовані, доведені.

Структуру теорії утворюють поняття, судження, закони, наукові положення, вчення, ідеї та інші елементи.

Поняття – це думка, що відбиває істотні та необхідні ознаки певної множини предметів або явищ.

Категорія – загальне, фундаментальне поняття, яке відображає найбільш істотні властивості та відношення предметів та явищ.

Науковий термін – це слово або сполучення слів, яке означає поняття, що застосовується у науці. Сукупність понять (термінів), які використовуються у певній науці, формують її понятійний апарат.

Судження – це думка, у якій стверджується або заперечується будь-що.

Принцип – це головна ідея, основне вихідне положення теорії.

Аксиома – це положення, яке є вихідним, таким, що не доводиться, та з якого за встановленими правилами виводяться інші положення.

Закон – це об'єктивний, істотний, внутрішній необхідний та стійкий зв'язок між явищами, процесами.

Закономірність – це: 1) сукупність дії багатьох законів; 2) система істотних, необхідних загальних зв'язків, кожен з яких становить окремий закон.

Положення – наукове ствердження, сформульована думка.

Вчення – сукупність теоретичних положень про будь-яку область явищ дійсності.

Ідея – це: 1) нове інтуїтивне пояснення події або явища; 2) визначальне, стрижневе, положення у теорії.

Концепція – це система теоретичних поглядів, поєднаних науковою ідеєю (ідеями).

Структуру емпіричного рівня дослідження складають факти, емпіричні узагальнення та закони (залежності). Поняття “факт” використовується у декількох значеннях: об'єктивна подія, результат, що належить до об'єктивної реальності (факт дійсності), або до сфери свідомості та пізнання (факт свідомості); 2) знання про будь-яку подію, явище, достовірність якого доведена (істина); 3) припущення, що фіксує знання, одержане в ході спостереження та експериментів. **Емпіричне узагальнення** – це система певних наукових фактів. **Емпіричні закони** відображають регулярність у явищах, стійкість у відношеннях між явищами, що спостерігаються. Однак, вони більш відображають поверхневий рівень залежностей, на відміну від теоретичних законів.

Етапи науково-дослідної роботи

Для успіху наукового дослідження його необхідно правильно організувати, спланувати та виконати у певній послідовності. Ці плани та послідовність дій залежать від виду, об'єкта та цілей наукового дослідження.

Стосовно робіт студентів-біологів можна накреслити такі етапи їх виконання:

- 1) підготовчий;
- 2) проведення теоретичних та емпіричних досліджень;
- 3) робота над рукописом та його оформлення;
- 4) впровадження результатів наукового дослідження.

Підготовчий етап включає: вибір теми, обґрунтування необхідності проведення досліджень за нею, визначення гіпотез, цілей та завдань дослідження, розробку плану або програми наукового дослідження, підготовку засобів дослідження (інструментарію). Спочатку формулюється тема наукового дослідження та обґрунтовуються причини її розробки. Шляхом попереднього ознайомлення з літературою та матеріалами раніше проведених досліджень

встановлюється ступінь дослідженості теми та наявність попередньо одержаних результатів. Особливу увагу слід приділити питанням, на які відповідей немає або вони неповні.

Дослідницький етап складається з систематичного вивчення літератури за темою, проведення експерименту, збору, обробки, узагальнення та аналізу отриманих даних, пояснення нових наукових фактів, аргументування та формулювання положень, висновків та пропозицій.

Описовий етап включає: визначення композиції (побудова внутрішньої структури) роботи, уточнення заголовка, назв глав та параграфів, підготовку чорнового варіанту рукопису та його редагування, оформлення тексту, у тому числі переліку використаної літератури та додатків.

Практичний етап складається зі впровадження результатів дослідження у практику. Слід зазначити, що наукові дослідження не завжди завершуються цим етапом, але іноді наукові роботи студентів (наприклад, дипломні роботи) рекомендуються для впровадження у практичну діяльність або навчальний процес.

Вибір теми

Студент, який розпочинає написання академічної роботи, зазвичай дотримується спеціальних кафедральних методичних вказівок, консультується у наукового керівника. Однак часто цього буває недостатньо. На допомогу студенту можна запропонувати деякі підручники та довідкові видання. Перед тим, як почати роботу, необхідно визначитися з темою. Як правило, на кафедрах факультету вузу пропонуються списки тем рефератів, курсових, дипломних та інших кваліфікаційних робіт, якими можуть скористатися студенти при виборі теми. Неможна зволікати з вибором теми, водночас студентам слід уникати тем, які суперечать їх науковим інтересам та бажанням. Студент має право вибору, яким він повинен обов'язково користуватися. Більше того, сам студент може запропонувати тему свого дослідження. Але найголовнішим тут є те, щоб назва роботи відповідала напрямку, який реалізується на кафедрі, та інтересам наукового керівника. Під час вибору вже сформульованої теми з переліку студентам слід зупинити увагу на тій, у якій вони краще орієнтуються, яка певною мірою їм знайома.

Обрану тему необхідно затвердити. Для цього слід зустрітися з викладачем, який буде науковим керівником, оскільки саме з ним будуть вирішуватися усі питання, пов'язані з написанням та оформленням роботи. Інші викладачі кафедри можуть виступати лише у ролі консультантів. Детальне обговорення обраної теми надзвичайно важливе, це пов'язано з низкою обставин:

- думка наукового керівника має визначити оцінку роботи;
- тема сама по собі не розкриває усіх вимог до оформлення роботи, які отримуються з особистих бесід з керівником;
- науковий керівник повинен знати, які питання найбільш цікавлять виконавця. Необхідно також на початку роботи обговорити час консультацій з науковим керівником.

На першому етапі консультацій з науковим керівником необхідно отримати від нього якомога більше інформації за темою. Усі вказівки керівника краще записати. Необхідно дізнатися про все, що може допомогти, особливо це важливо у випадку, коли кваліфікаційна робота є першою серйозною роботою письмовою роботою у вузі. Особливу увагу слід приділити відомостям стосовно переліку літератури, який використовується для написання тексту, та орієнтовному плану роботи. Назви навчальної літератури та інших матеріалів необхідно наводити повністю – прізвища та ініціали авторів та рік видання, інакше можна витратити багато часу на пошук цих джерел у бібліотечному каталозі чи у мережі Internet. Приблизний план роботи вже на перших етапах роботи дозволить врахувати більшість вимог викладача до змісту майбутнього тексту, а також усуне необхідність перегрупування окремих частин роботи, скорочення або доповнення її. Водночас саме такий план дозволить не підганяти одержані нові матеріали та ідеї до жорстко заданої схеми. Відомості про методи (способи) розкриття теми містяться у спеціальних методичних посібниках, які можна одержати безпосередньо від викладача або на кафедрі, у навчальній частині факультету вузу.

Для затвердження теми курсової, дипломної роботи та дисертації необхідна офіційна згода наукового керівника та спеціальне рішення кафедри. Але навіть після формального затвердження тему будь-якої роботи у процесі написання завжди можна скоректувати для найбільшої відповідності змісту. Водночас існують й такі формальні вимоги, від яких відступати неможна та яких слід дотримуватися обов'язково. Це передусім оформлення курсових та випускних робіт, більша частина вимог до якого універсальна для усіх вузів. Відносно рефератів, доповідей, контрольних, звітів тощо подібні вимоги, як правило, визначаються конкретно кафедрою факультету вузу.

Таким чином, отримавши тему та затвердивши її, урахувавши усі побажання та рекомендації наукового керівника, можна починати працювати. Найголовніше на першому етапі роботи – знайти та отримати необхідні наукові матеріали.

Планування та проведення біологічного експерименту

Експеримент (від лат. *experimentum* – дослід) – штучно створений комплекс умов, у яких досліджують вплив чинника або групи чинників на результативну ознаку. Припущення, висунуті дослідником перед початком експерименту, можуть бути підтвердженими або спростованими. Якщо у процесі повторних дослідів за аналогічних умов будуть отримані подібні результати, то їх можна визнати вірогідними. За своєю суттю наукові знання є динамічними, вони формуються у процесі полеміки, а вірогідність наукових методів постійно піддається сумніву. Це означає, що як гіпотези, так і усталені теорії з часом і в міру того, як збільшується сукупність знань та удосконалюються методи наукових досліджень, піддаються сумнівам, видозмінюються, заперечуються і навіть відхиляються.

Планування наукової роботи має надзвичайно велике значення для раціональної організації досліджень. У ході планування науково-дослідної роботи потрібно враховувати все, що можна заздалегідь передбачити, з метою забезпечення високої якості роботи і недопущення затримки або зриву її в будь-

чому. Робота за недосконалим планом може призвести до одержання експериментальних результатів сумнівної якості. Мета планування – за якомога мінімальних обсягів спостережень отримати досить повну інформацію про досліджувані об'єкти.

У процесі дослідження багатofакторних систем можливі два підходи:

1. “Змінюй фактори по одному” – дослідження системи розбивається на серії, у межах кожної з яких змінюється лише один чинник, а інші залишаються незмінними. У наступній серії змінюється другий чинник і так далі. Головна перевага – наочність, дані кожної серії легко інтерпретуються. Часто цей підхід називають **пасивним**.

2. **Активний** експеримент. Його ідея – побудувати план експерименту, який передбачає зміни усіх факторів впливу з тим щоб цей план забезпечував максимум точності та інші позитивні статистичні властивості. Такий експеримент ще називають **багатofакторним**, він набагато ефективніший за перший, оскільки за того ж об'єму експерименту досягається більша точність результатів.

У ході планування наукових досліджень також необхідно:

- чітко визначити мету дослідження та усвідомити, наскільки обсяг цієї роботи знаходиться у межах можливого;

- згідно з правилами випадкового відбору без будь-якого упередження підготувати експериментальну та контрольну групи (наприклад, піддослідних тварин);

- виявити наявність додаткових та другорядних факторів, які можуть вплинути на об'єм досліджуваних явищ;

- підібрати найбільш адекватні методи статистичної обробки одержаних результатів, а також можливість обробки результатів за допомогою ЕОМ;

- скласти таку схему досліджень, яка дозволила б порівняти одержані результати між собою та з результатами інших дослідників.

Системність у роботі, зосередженість і наполегливість у вирішенні поставлених завдань, критична і скромна оцінка одержаних результатів – запорука успіху науково-дослідної роботи. Тільки плановість, чітка послідовність виконання завдань, регулярний самоконтроль і перевірка виконання забезпечать належну продуктивність будь-якої роботи.

Загальні правила проведення експерименту:

1. Якщо це можливо, необхідно усунути найбільшу кількість випадкових впливів на досліджувану ознаку. При цьому експериментальні тварини мають бути одного біологічного виду, однієї генетичної лінії, однієї статі та віку. Тварини кожної групи повинні утримуватися в однакових умовах (раціон, тривалість світлової доби, кількість тварин у клітці, розміри кліток тощо). Для рослин крім виду та віку велике значення має вік окремих його частин, а якщо це деревна рослина – сторона світу, з якої відбирають зразки.

2. Для запобігання можливих випадкових помилок необхідно:

- проводити усі вимірювання в ході одного експерименту на одному й тому самому приладі;
- точно готувати розчини, використовуючи так звані маточні розчини, концентрати;
- усі виміри одного плану повинні проводитися за можливості однією людиною.

3. Реєстрація результатів. Усі умови та результати експерименту повинні в обов'язковому порядку бути зафіксованими в лабораторному журналі або протоколі досліду. Туди заносять дату проведення експерименту, мету, прізвища виконавців, умови проведення, результати. Протокол має бути підписаний керівником, що дозволяє задекларувати свій пріоритет на отримані дані. Лабораторний журнал або протокол є офіційним документом. Це первинні результати будь-якої наукової роботи: диплому, статті, дисертації.

Лабораторні тварини

Більша частина експериментальних досліджень у біолого-медичного напрямку, особливо в фізіології, біохімії, а також тестуванні нових фармакологічних препаратів за доклінічних випробувань проводяться з використанням різних піддослідних тварин. Лабораторні тварини умовно можна розділити на такі групи:

1. **Традиційні** (звичайні, конвенційні) лабораторні тварини. До цієї групи входять тварини, які вже протягом 50–100 років використовуються для проведення науково-дослідної роботи (безпородні білі миші та щури, собаки, кішки, кролі, морські свинки, жаби тощо).

2. **Домашні і сільськогосподарські** тварини, які використовуються як лабораторні (кози, свині, вівці, телята, коні, кури, гуси, качки тощо).

3. **Генетично контрольовані** тварини, використання яких дає можливість отримувати однорідні результати (інбредні та конгенні лінії, гібриди різних ліній, мутанти). До цієї групи належать **лінійні** тварини – гомозиготні тварини однієї породи, яка походить від одного самця – родоначальника лінії, який має господарські або інші цінні якості. Інбредні лінії лабораторних тварин, які мають додатковий чужерідний ген, називаються **конгенними (коізогенними)** лініями.

4. **Гнотобіоти** (“стерильні” лабораторні тварини) – це тварини, в організмі яких немає мікроорганізмів, гельмінтів, членистоногих тощо, такі тварини контролюються щодо мікрофлори. До безмікробних належать, зокрема, безвірусні тварини. Ще одна група “стерильних” тварин – це безантигенні. Найширше використовуються в дослідках безмікробні (стерильні) і проміжні між гнотобіотами та звичайними лабораторними тварини: миші, щури, морські свинки, рідше – собаки, мініатюрні свині, телята.

5. **Нові види лабораторних тварин.** До цієї групи входять такі дрібні лабораторні тварини-гризуни, як золотистий, сірий і джунгарський хом'ячки, піщана монгольська, звичайна, руда, темна, степова полівки, білки, бабаки, ховрашки; морські тварини: дельфіни, морські їжаки та морські зайці, восьминоги; сумчасті: кенгуру, опосуми; плазуни: ящірки, крокодили; деякі

представники риб, земноводних, комах, деякі види мавп. Ці види тварин є необхідними для моделювання найбільш адекватних захворювань людини і тварин, для вирішення питань трансплантації тощо.

З урахуванням анатомо-фізіологічних особливостей тварин, інтенсивності їх росту, змін у статевій системі тощо розроблена класифікація вікових періодів індивідуального розвитку білих мишей та щурів, морських свинок, кролів, собак, кішок, золотистих хом'ячків. Згідно з цією класифікацією, постнатальний розвиток тварин умовно поділений на чотири періоди (I – період молочного годування (вік новонароджений, вік підсисний); II – період статевого дозрівання (вік нестатевозрілий – інфантильні тварини, вік до спарювання – ювенільні тварини); III – період репродуктивний (вік молодий, вік зрілий); IV – період виражених старечих змін (вік передстаречий, вік старечий, вік гранично старечий).

У процесі підбору лабораторних тварин для проведення довготривалих досліджень, у тому числі для вивчення хронічної дії різних чинників довкілля, а також харчових, лікарських та інших речовин, необхідно враховувати такі фактори:

- стійкість відібраних тварин до інфекційних хвороб;
- дані про середню тривалість життя тварин;
- дані про каріотип, особливості вікової зміни імунного статусу, анатомо-фізіологічні, біохімічні, морфологічні та інші ознаки;
- особливості живлення і діяльності органів травлення;
- особливості утримання піддослідних тварин та догляду за ними відповідно їх життя на волі.

У певних випадках виникає потреба введення в організм лабораторних тварин досліджувані препарати, а також взяття крові для аналізу. Розроблені такі способи введення хімічних препаратів до організму тварин: оральне, інтраназальне, ректальне, шкірне, підшкірне, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревне, внутрішньовенне, внутрішньосерцеве, внутрішньомозкове, субокципітальне.

Тварини, у яких унаслідок експерименту знизилася життєздатність, підлягають умертвінню (евтаназії) гуманним способом. Умертвіння тварин не повинно виконуватися у приміщенні, де знаходяться інші тварини. Умертвіння тварин для вилучення досліджуваних органів і тканин рекомендується проводити декількома способами. Дрібних тварин умертвляють часто шляхом декапітації, при цьому доцільно використовувати спеціальні гільйотини. Крупні тварини умертвляються, як правило, шляхом передозування наркотичних речовин (ефіру, хлороформу, барбітуратів тощо). Свиней, великих собак та інших великих тварин умертвляють, пропускаючи електричний струм накладанням електродів у ділянку довгастого мозку та крижів. Ще одним способом умертвіння є відтворення множинної повітряної емболії внутрішньовенним введенням повітря або повним обезкровлюванням з використанням різних методів обезболювання. У разі необхідності дослідження ультраструктури органів дрібних тварин застосовується метод миттєвого умертвіння шляхом замороження в рідкому азоті.

З метою додержання принципів наукового проведення експериментальних досліджень на лабораторних тваринах і гуманного ставлення до піддослідних тварин у ряді міністерств та академій України створені комісії з експериментальної роботи з тваринами. Україна є членом Міжнародної федерації із захисту тварин, яка ухвалила спеціальні постанови щодо обмеження використання тварин для експериментів, а також правила поводження з ними. Для виконання експериментальних досліджень на тваринах допускаються лише особи, які мають відповідну вищу освіту, причому після того, як ними будуть засвоєні правила поводження з лабораторними тваринами і отримані практичні навички. Особи, які мають відповідну середню освіту, лаборанти і студенти, можуть виконувати нескладні і безболісні процедури на тваринах тільки і лише після ознайомлення з правилами поводження з лабораторними тваринами і оволодіння певними навичками під контролем наукового співробітника.

Порушення вимог проведення експерименту і правил гуманного ставлення до тварин ставить під сумнів наукову цінність досліджень, тягне за собою дисциплінарне покарання, а також заборону наукових публікацій і захист дисертацій.

Всесвітня декларація поводження з тваринами

(Гуманітарний екологічний журнал. –Т.5. – Спецвипуск, 2003. – С. 35–39).

Стаття 8. Живі тварини у наукових дослідженнях

1. Використовувати тварин для наукових досліджень та експериментів можна лише у випадках, необхідних для добробуту людини або інших тварин, у тому числі:

- для розробки ліків, засобів профілактики або лікування деяких захворювань;
- розробки безболісних або оздоровчих засобів;
- визначення ступеня шкідливості отруйних речовин, якщо альтернатив не існує.

2. Коли існує доведена необхідність використання тварин для наукових досліджень та експериментів, то необхідно забезпечити, щоб:

- кількість тварин, що використовуються, була зведена до мінімуму;
- були зведені до мінімуму або зм'якшені біль та страждання;
- протягом усього життя ці тварини утримувалися у відмінних умовах та був забезпечений їх добрий догляд.

3. Завжди, коли це можливо, експерименти над тваринами повинні бути замінені альтернативними методами, причому такі альтернативи необхідно розвивати, досліджувати та легалізувати.

4. Використання тварин для наукових досліджень та експериментів повинно бути заборонено, коли:

- інформація, що має аналогічну наукову цінність, може бути отримана без використання тварин;
- інформація, що має аналогічну наукову цінність, вже існує;
- результати не являються необхідними для людини або для тварин.

Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях (Страсбур, 18 березня 1986 року).

Експерименти з використанням тварин можна проводити з метою:

- попередження хвороб, слабкого здоров'я, інших аномалій або їх наслідків для людини, хребетних та безхребетних тварин або рослин, включаючи перевірку якості, ефективності та нешкідливості медикаментів, речовин та продуктів, а також процесів їх виробництва;
- діагностика та лікування хвороб та інших аномалій або їх наслідків у людини, хребетних та безхребетних тварин або рослин;
- захист навколишнього середовища;
- наукові дослідження;
- судово-медичні дослідження;
- експерименти на тваринах можуть проводитися лише під безпосередню відповідальність компетентної особи, яка має відповідний дозвіл, або у рамках наукового проекту, який має дозвіл відповідно до положень національного законодавства;
- піддослідні тварини: миша, щур, морська свинка, золотистий хом'ячок, кролик, кішка, собака, – повинні бути отримані із зареєстрованих установ-розплідників або установ-поставників.

ТЕМА 3. СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

В останні 20-30 років біологія та медицина увійшли в нову фазу свого розвитку. Накопичення великих масивів якісних даних підсилило математизацію біології. Факти – це “повітря вченого”, наука спирається на факти, їх не можна ігнорувати. Однак, маса фактів ще не складає зміст науки. Факти та спостереження мають бути оброблені математично або статистично. Роль статистичних методів у біології подвійна: з одного боку вони дозволяють безпосередньо виявити невідомі закономірності, а з іншого – перевірити вірогідність висновків, сформульованих апріорно. Очевидно, що істинність висновків, сформульованих на основі одержаних експериментальних даних, багато у чому визначається адекватністю обраних методів статистичної обробки. Тому питання статистики посідає провідне місце у роботі біолога. Практично немає такого методу статистичного аналізу, який не знайшов би свого застосування у біології.

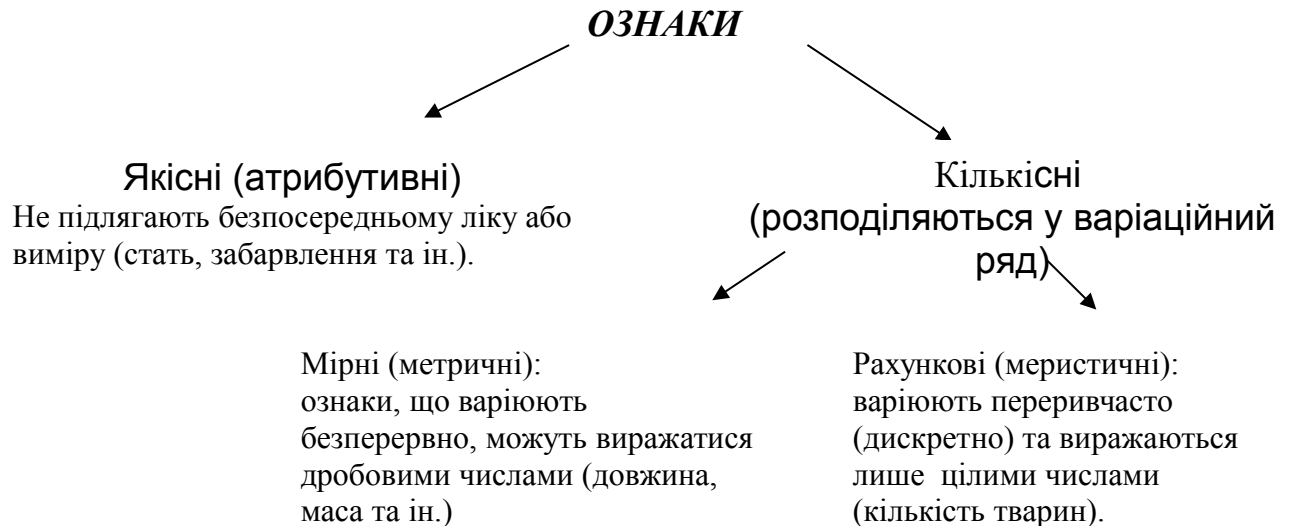
Предметом біометрії служить будь-який біологічний об'єкт, який досліджується за допомогою міри або лічби, тобто з кількісного боку з метою точної оцінки його якісного стану. При цьому досліджуються не одиничні, а групові об'єкти, тобто явища масові.

Одиниці спостереження – складові елементи, або члени групового об'єкта, що досліджується. Це є особини з відносно однаковими ознаками.

Статистична сукупність – множина відносно однорідних, але індивідуально розрізнених одиниць, що об'єднані для сумісного (групового) дослідження.

Статистичний комплекс – ряд груп (статистичних сукупностей), об'єднаних для сумісного вивчення.

Ознака – це властивість, проявом якої один предмет відрізняється від іншого. Характерною властивістю біологічних ознак є варіювання величини ознак в певних межах під час переходу від однієї одиниці спостереження до іншої.



Варіація – коливання величини однієї й тієї самої ознаки, яке спостерігається у масі однорідних членів статистичної сукупності.

Варіанта – окремі числові значення ознаки, що варіює.

Величина будь-якої ознаки, що варіює, є змінною випадковою величиною. Ознаки позначають великими латинськими літерами, наприклад, X , Y , Z , а їх числові значення, тобто варіанти, малими – $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ або $y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$.

Біологічні ознаки варіюють під впливом найрізноманітніших, у тому числі й випадкових, причин. Тому усі вимірювання, як би вони ретельно не були виконані, дають не точне, а лише приблизне значення. Різниця між результатом вимірювання x_i та істинним значенням x величини, що визначають, $(x_i - x)$ називається **похибкою вимірювання**, або **погрішністю**. Похибка зазвичай не відома, оскільки не відомо й істинне значення величини, що визначають. Тому основним завданням математичної обробки результатів експерименту є оцінка вірогідного значення величини, що визначається, а також визначення відповідної похибки та ймовірність її появи.

Похибки експерименту розділяють на три групи:

1. **Грубі похибки** – виникають внаслідок порушення основних умов експерименту чи в результаті недбалості експериментатора. Вони різко відрізняються за величиною від інших значень, на чому й засновані деякі критерії їх виключення з розгляду. У випадку грубої похибки результат слід відкинути, а саме вимірювання, якщо це можливо, повторити.

2. **Систематичні похибки:**

- технічні: виникають внаслідок несправності або неточності приладів та інструментів вимірювання, низької якості реактивів;
- особисті: залежать від особистих якостей дослідника, його навичок та майстерності у роботі.

Виявити систематичні похибки, які переходять з експерименту в експеримент, можна, вимірюючи одну й ту саму величину різними методами. Вони мають бути виявлені та зведені до малих величин за допомогою відповідних поправок.

3. Випадкові похибки – можуть бути наслідком впливу великої кількості різноманітних чинників на результат вимірювання, у тому числі й біологічної мінливості. Ці похибки не можуть бути враховані та усунені шляхом введення поправок, оскільки вони не визначені ні за величиною, ні за знаком. Однак, за допомогою методів теорії ймовірностей можна урахувати їх вплив на оцінку істинного значення величини, що вимірюється.

Отже, варіювання результатів спостереження викликають причини подвійного роду: природна мінливість ознак та похибки вимірювання.

Для характеристики об'єктів, що варіюють, використовуються числові показники двох типів: середні величини та показники варіації.

Середні величини

Середнім величинам, на відміну від окремих варіант, притаманна більша стійкість, здатність характеризувати цілу групу однорідних одиниць одним (середнім) числом. Значення середніх полягає в їх властивості акумулювати або врівноважувати усі індивідуальні відхилення. Середні величини бувають **ступеневі** та **структурні** (неступеневі).

Найбільш розповсюдженою ступеневою середньою є середня арифметична, що розраховується за формулою $M = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$, де x_i – варіанти сукупності, n – загальна кількість варіант, або об'єм сукупності.

Структурні середні, як правило, являють собою конкретні варіанти сукупності, які займають певне місце в ряду розподілення. **Медіана** – неступенева середня, відносно якої ряд розподілення ділиться на дві рівні частини, по обидва боки від медіани розташовується однакова кількість варіант. **Мода** – величина, що найбільш часто зустрічається у сукупності. Медіана та мода часто використовуються як середні показники для характеристики малих вибірок ($n < 30$).

Показники варіації ознаки

Середні величини не є універсальними характеристиками об'єктів, що варіюють. За однакових середніх ознаки можуть відрізнятися за величиною та характером варіювання. Тому для більш повного опису ознаки, що варіює, доцільно використовувати показники варіації.

Ліміти (*lim*) – значення мінімальної (x_{min}) та максимальної (x_{max}) варіант сукупності.

Розмах варіації (розмах коливань) – різниця між максимальним та мінімальним значеннями ознаки у досліджуваній сукупності:

$$R = x_{\max} - x_{\min}.$$

Перевага – простота розрахунку. Недолік – розмах варіації залежить лише від величини крайніх значень ознаки, область його застосування обмежена досить однорідними сукупностями. Більш зручними характеристиками варіації є ті, які будуються на основі відхилення варіант від їх середньої.

Середнє лінійне відхилення – сума відхилень, узята без урахування знаків та віднесена до числа спостережень n :

$$\bar{d} = \frac{\sum |x_i - M|}{n}.$$

Дисперсія – це середня з квадратів відхилення варіант значень ознаки від їх середньої величини:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (x_i - M)^2}{n - 1},$$

де $n - 1 = k$ – число ступенів вільності.

Середнє квадратичне відхилення – показник, який є коренем квадратним з дисперсії:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{n - 1}}.$$

Цей показник більш зручний, ніж дисперсія, оскільки виражається в тих самих одиницях, що й середнє. Дисперсія та середнє квадратичне відхилення характеризують не лише величину, а й специфіку варіювання ознак (чим менший ступінь варіювання ознаки, тим меншими будуть величини σ чи σ^2).

Генеральна сукупність та вибірка

Генеральна сукупність – загальна кількість значень будь-якого вимірювання, що нескінченно повторюється, за $n \rightarrow \infty$, тобто це уся сукупність даних об'єктів (наприклад, усі щури лінії Вістар, усі хворі на малярію). Повне обстеження сукупності дозволяє отримати вичерпну інформацію про досліджуваний об'єкт чи явище. Однак, до суцільного спостереження вдаються вкрай рідко, оскільки така робота пов'язана з великими витратами часу та праці, а також через практичну її неможливість або недоцільність. У більшості випадків дослідженню підлягає певна частина сукупності, що обстежується. Кінцева кількість визначень (набір варіант, одержаний у ході експерименту) називається **вибірковою сукупністю**, або **вибіркою** ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ або $x_i, i = 1, 2, 3, \dots, n$), де n – обсяг вибірки. Обсяг вибірки може бути і великим, і малим, але він не може містити менше, ніж два елементи. Таким чином, вибірка є моделлю генеральної сукупності. Числові характеристики (середні, показники варіації), які розраховуються для вибірки, є не точними, а приблизними оцінками відповідних генеральних параметрів, які, як правило, залишаються невідомими. Величину відхилення вибіркового показника від його генерального параметра називають **статистичною похибкою**, або **похибкою репрезентативності**. Статистичні похибки притаманні лише вибірковим характеристикам, вони виникають у процесі відбору варіант з

генеральної сукупності. Похибки репрезентативності бувають **точкові** та **інтервальні**.

До точкових похибок репрезентативності належить **середня квадратична похибка середньої арифметичної**, або **похибка середньої** (m), яка визначається за формулою $m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$, де σ – середнє квадратичне відхилення, n – об'єм сукупності.

Чим краще вибіркова характеристика описує свій генеральний параметр, чим краще сформована вибірка, чим точніше проведений експеримент, тим менша величина m і навпаки. Звичайно під час оформлення результатів досліджень дані подають у вигляді середньої величини \pm похибки середньої ($M \pm m$).

До інтервальних оцінок належить **довірчий інтервал**. За відомими вибірковими характеристиками можна побудувати інтервал, у якому з тією чи іншою ймовірністю знаходиться генеральний параметр. Довірчим інтервалом $\Delta = t_p m$, де t_p – довірча вірогідність, або надійність; m – похибка середньої, називається величина, що відкладається по обидва боки від вибіркової середньої M та обмежує можливі границі коливань цієї середньої навколо генеральної середньої \bar{X} . Довірча вірогідність, або надійність (p) – це ймовірність того, що істинне значення середньої генеральної сукупності потрапляє в інтервал

$$M - t_p m < \bar{X} < M + t_p m.$$

У процесі біологічних досліджень необхідно не лише отримувати ті або інші результати, але й робити висновки, тому дуже важливо, щоб вони мали досить високу достовірність. Як правило, мінімально допустима довірча вірогідність, рекомендована під час визначення довірчих інтервалів у біологічних дослідженнях, дорівнює 95 % ($p = 95$, або $p = 0.05$). Рівень значущості $P = 1 - 0,95 = 0,05$ або 5 %. Він вказує, що похибка можлива у 5 випадках зі 100.

Для одержання статистично значимої середньої необхідно довести, що середня генеральної сукупності з надійністю 95 % потрапляє до інтервалу $M \pm 0,1M$. Задавши таку надійність та довірчий інтервал, розпочинають постановку експерименту. Отримані дані статистично обробляють, визначають M , σ , m , а потім за заданим довірчим інтервалом (як правило 10 % від M) розраховують коефіцієнт Стьюдента:

$$t_{\text{дєт.}} = \frac{\Delta}{m}, \text{ де } \Delta = 10 \% \text{ від } M.$$

Враховуючи кількість варіант, знаходять число ступенів вільності $f = n - 1$ та за таблицею Стьюдента для надійності $p = 0,95$ знаходять критичну точку критерію Стьюдента $t_{\text{табл.}}$. Далі порівнюють розрахункове значення коефіцієнта Стьюдента та його табличну величину. У тому випадку, коли $t_{\text{експ.}} \geq t_{\text{табл.}}$, роблять висновок про статистичну значимість середньої арифметичної.

ТЕМА 4. ОФОРМЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Усі матеріали, отримані в процесі дослідження, розробляють, систематизують та оформляють у вигляді наукової роботи. Це документ, який містить вичерпні систематизовані відомості про виконану роботу. Загальні вимоги до науково-дослідної роботи: чіткість та логічна послідовність викладення матеріалу; переконлива аргументація; стислість та точність формулювань, які виключають можливість неоднозначного тлумачення; конкретність викладення результатів роботи; ґрунтовність рекомендацій та пропозицій. Загальну структуру науково-дослідної роботи можна надати так:

- титульний аркуш;
- реферат;
- зміст;
- вступ;
- основна частина;
- висновки;
- перелік використаних джерел;
- додатки.

Титульний аркуш – це перша сторінка рукопису, на якій вказані повні назви міністерства, навчального закладу, факультету, кафедри, заголовки, відомості про автора та наукового керівника, місце та рік виконання роботи. У середній частині титульного аркуша пишеться заголовок роботи. Вказується вид роботи (реферат, курсова або дипломна робота). Ближче до правого боку аркуша, пишуться прізвище, ім'я та по-батькові автора. Далі вказується вчений ступінь, вчене звання, прізвище, ім'я та по-батькові наукового керівника. У нижній частині титульного аркуша вказуються місце та рік написання роботи.

Зміст розкриває структуру роботи шляхом позначення глав, параграфів та інших рубрик наукової роботи з позначенням сторінок, з яких вони починаються. Він повинен бути на початку роботи. Назви глав та параграфів мають точно повторювати відповідні заголовки у тексті.

Вступ роботи має містити оцінку сучасного стану наукової проблеми, що вирішується, підстави та вихідні дані для розробки теми, обґрунтування необхідності виконання роботи. У вступі повинні бути показані актуальність та новизна теми, зв'язок даної роботи з іншими науково-дослідними роботами. Звичайно обсяг вступу не перевищує 5–7 % обсягу основного тексту.

Основна частина може складатися з декількох глав, розбитих на параграфи. У них викладаються теоретичні положення, надається аналіз різних поглядів, висказується та аргументується власна думка. У кінці кожної глави робляться короткі висновки.

Останній розділ повинен містити висновки за результатами виконаної наукової роботи та вказівки про можливість їх впровадження. Обсяг висновків не повинен перевищувати 5–7 % обсягу основного тексту.

До переліку літератури включають лише ті праці, які були використані в ході написання та згадані у тексті або виносках. Перелік складається за розділами з урахуванням вимог державного стандарту.

У додатки включаються витяги з окремих нормативних актів, копії оригінальних документів, витяги з довідок, звітів, зразки анкет, таблиці, графіки та інші допоміжні матеріали, які захарашують основну частину роботи та збільшують її об'єм. Під час підрахунку обсягу наукової роботи додатки не враховуються.

Розділення тексту на складові частини з використанням заголовків, нумерації та інших засобів називається **рубрикацією**. Система рубрик включає заголовки частин, розділів, глав та параграфів, які, як правило, нумеруються. Кожна з названих частин тексту, у свою чергу, підрозділяється на абзаци. Під абзацом розуміють відступ вправо на початку першого рядка певної частини тексту. Поняття “абзац” позначає також ту частину тексту, яка знаходиться між двома такими відступами. Зазвичай абзац складається з декількох речень, зв'язаних між собою певною думкою. Абзаци одного параграфу або глави повинні бути також пов'язані між собою за змістом та розташовані у логічній послідовності.

Рубрикація тексту пов'язана з нумерацією – числовим або літерним позначенням послідовності розташування його складових частин. Для цього використовуються римські або арабські цифри, прописні та рядкові літери. Розділи, підрозділи, пункти та підпункти необхідно нумерувати арабськими цифрами та записувати з абзацного відступу. Розділи повинні мати порядкову нумерацію в межах усього тексту. Глави нумерують римськими цифрами.

Згідно з Державним стандартом України “Документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура і правила оформлення” (1995 р.), результати статистичної обробки наукових досліджень чи спостережень вносяться в таблиці або ілюстрації (графіки, рисунки, схеми, діаграми, фотознімки тощо).

Правила оформлення таблиць

Перевагою таблиць над іншими видами ілюстрацій є компактність навіть за великого обсягу цифрового матеріалу.

Слово “Таблиця _____” пишеться без скорочення і розміщується зліва. Кожна таблиця повинна мати назву, яку розміщують над таблицею після слова “Таблиця _____”, вона друкується малими літерами (крім першої великої) без підкреслення. Назва має бути стислою і відбивати зміст таблиці.

Цифрова інформація повинна заноситися до таблиці з однаковим ступенем точності, причому запис результатів необхідно вести з такою кількістю знаків, яка відповідає найменш точному результату.

Приклад:

Таблиця _____

(номер)

(назва)

Головка						Заголовок граф
						Підзаголовок граф
						Рядки
	Боковик (заголовки рядків)		Графи (колонки)			

Якщо результати заносяться у вигляді $M \pm t$, то величина похибки середньої (t) має бути на один порядок більше, ніж у середньої (M). Наприклад:

неправильно

$5,7237 \pm 1,4$

$8,4 \pm 2,612$

$0,237 \pm 0,01$

$8,72 \pm 3$

правильно

$5,7 \pm 1,40$

$8,4 \pm 2,61$

$0,2 \pm 0,01$

$8,7 \pm 3,00$

Числа, які мають більшу точність, округляють до розряду чисел з найменшою точністю. Кількість знаків після коми у числах, зведених до таблиці, повинна бути однаковою. Для полегшення статистичної обробки дробові числа можна перетворити на цілі шляхом множення на 10^n ($2,84 \times 10^2 = 284$). Після завершення розрахунків кінцевий результат слід розділити на те ж число.

Якщо дані у певному стовбці таблиці не наводяться, у ньому ставлять прочерк. Елементи статистичної обробки ($M \pm t$, P та ін.) проставляються або під таблицею, або включаються в таблицю окремою графою чи без неї. У разі необхідності вміщують примітки, які розташовуються безпосередньо під таблицею у вигляді виноски.

Ілюстрації – це наочні графічні зображення, які слугують додатковим поясненням чи доповненням текстових положень науково-дослідної роботи. Усі ілюстрації, без винятку, супроводжуються підписом, який розкриває їхній зміст. Позначення “Рис. __” (не “мал. __”!) розміщується під ілюстрацією і після номера дається тематичний заголовок, а у разі необхідності й пояснення чи вказівки (експлікація).

Графік – це геометричне наочне зображення, висвітлення функціональної залежності за допомогою ліній на площині, він служить для знаходження значень функції за значенням аргументу. Графіки виконуються в системі координат (ординати, абсциси). На ординатах (вісь y) відкладаються величини залежної змінної, тобто функції. Горизонтальна вісь (x) має значення, які показують величину незалежної змінної, це змінна, значення якої вибираються дослідником. З побудованого на основі фактичних даних графіка можна знайти інші проміжні

значення. Для цього необхідно виміряти координати будь-якої точки, яка лежить на лінії. Цей метод називається інтерполяцією. Подібним чином, якщо продовжити лінію, можна визначити координати крайніх точок графіка. Цей метод називається екстраполяцією.

Як різновид координатних рисунків для графічного та наочного зображення залежності між величинами і аналізу масиву даних у біологічній практиці часто використовуються **діаграми**. Характерною особливістю всіх видів діаграм є висока наочність та інформативність, завдяки чому їх можна зрозуміти навіть не звертаючись до тексту. За характером подання цифрового матеріалу діаграми поділяються на лінійні, стовпкові (стовпчикові), секторні, площинні тощо.

Схема – це умовне безмасштабне зображення, за допомогою якого передається основна ідея будь-якого процесу, механізму, предмета, пристрою. Схема складається з окремих елементів системи і зображується у вигляді геометричних фігур з позначеннями всіх зв'язків між ними. Підписи, цифри або літери (абrevіатурні скорочення) вміщуються всередині фігур, а їх розшифрування виводиться в підпис до ілюстрації або наводиться в тексті. Залежно від характеру викладеного матеріалу схеми можуть різнитися за призначенням. Схеми бувають структурні, функціональні, принципіві, блок-схеми тощо. Специфіка деяких біологічних досліджень потребує такого документально-ілюстративного матеріалу, як фотографія, діапозитиви, негативні плівки тощо. Вони можуть виконувати роль наукової, технічної та хронікально-інформативної ілюстрації.

Ілюстрації та таблиці необхідно подавати безпосередньо після згадування про них у тексті або на наступній сторінці. Номери рисунків, таблиць, а також формул складаються з номера розділу та їх власного порядкового номера (*.*). Під час перенесення частини таблиці на другу сторінку вгорі слід вказувати “Закінчення табл. *.*”.

Правила цитування літератури та оформлення посилань. Посилання на першоджерело у тексті вказують порядковим номером їх за переліком у квадратних дужках [*]. Перелік використаних джерел можна подавати:

- у порядку появи у тексті (найбільш зручний та рекомендований);
- в алфавітному порядку прізвищ перших авторів або заголовків;
- у хронологічному порядку.

Книги:

Василенко, М.В. Теорія коливань [Текст]/ М.В. Василенко. – К.: Вища шк., 1992. – 430 с.

Статті:

Кокунин, В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов [Текст]/ В.А. Кокунин. – Укр. биохим. журн. – 1975. – Т. 47, № 6. – С. 776-790.

Perez, K. Radiation therapy for cancer of the cervix [Text]/ K. Perez. – Oncology. – 1993. – Vol. 7 (2). – P. 89-96.

Дисертації:

Тихомиров, А.О. Характеристика білка проміжних філаментів головного мозку щурів за умов впливу іонів алюмінію та іонізуючого випромінювання [Текст]: дис. канд. біол. наук: 03.00.04 /А.О. Тихомиров – Д., 2005. – 164 с.

Основні вимоги до написання, оформлення та захисту наукових робіт

Реферат – науково-дослідна робота, яка являє собою коротке викладення у письмовому вигляді змісту наукових праць, навчальних посібників, наукових статей за заданою темою. У рефераті студент викладає основні положення, що містяться у декількох джерелах, наводить різні погляди, обґрунтовує власну думку щодо них. Реферат складається з титульного аркуша, заголовка, вступу, основної частини та переліку використаної літератури. Обсяг реферату – не менше 5 та не більше 15 сторінок, надрукованих через 1,5 інтервалу. У рефераті слід робити посилання на використані джерела. Вони повинні бути оформлені відповідно до встановленого стандарту. Готовий реферат надається викладачу для перевірки. Оцінюючи реферат, він враховує вміння студента працювати з науковою літературою, аналізувати різні думки з суперечливих питань, аргументувати свою думку, навички оформлення посилань, переліку використаної літератури.

Доповідь – це частина усного повідомлення на певну тему. Вона призначена для прочитання на семінарському занятті, науковій конференції. Якщо текст доповіді має бути зданий викладачу, то він оформлюється так само, як і текст реферату. У тих випадках, коли здавати текст не вимагається, достатньо його підготувати для себе без оформлення. Текст доповіді може бути написаний повністю або у вигляді тез. В останньому випадку в логічній послідовності записуються лише основні думки. Студентські доповіді, як правило, складаються з трьох частин: вступної, основної та заключної. У першій частині обґрунтовуються актуальність, теоретична та практична цінність теми, у другій викладаються основні наукові положення, у третій – висновки.

На відміну від стендової доповіді слухачі не можуть близько підійти до ілюстративного матеріалу. Тому ілюстрації та підписи до них потрібно робити дуже крупно на ватманах (щоб їх можна було прочитати з відстані декількох метрів) або виводити їх на великий екран за допомогою кодоскопа (потрібно підготувати роздруківки на спеціальній прозорій плівці), відеопроєктора (на відеокасеті) або комп'ютерній презентації у програмі MS PowerPoint. Про необхідність використання будь-яких технічних засобів (кодоскоп, слайди або відеопроєктор, камера та ін.) слід заздалегідь попередити організаторів.

Курсова робота – це передбачена навчальним планом письмова робота студента на певну тему, яка містить елементи наукового дослідження. Написання курсової роботи допомагає студентам поглибити та закріпити одержані знання з дисципліни, набути навичок самостійного проведення наукових досліджень та узагальнення практичного матеріалу, оформлення результатів творчої праці. Перелік тем курсових робіт визначається кафедрами. Студенту надається право вибору теми. Після узгодження з науковим керівником студенту дозволяється виконання роботи за темою, яка хоча й не зазначена у переліку, але має пряме відношення до дисципліни, що вивчається. Обрана тема має бути зареєстрована на

відповідній кафедрі. Науковим керівником студента є, як правило, викладач, який проводить заняття у тій групі, де він навчається. З ним необхідно узгодити план роботи, перелік нормативних актів та спеціальної літератури, метод збору та обробки практичних матеріалів та термін здачі на перевірку. З метою впорядкування основних етапів роботи корисно скласти робочий план зі зазначенням термінів закінчення кожного етапу.

Структура курсової роботи:

- титульний аркуш;
- зміст;
- вступ;
- основна частина;
- висновки;
- перелік використаної літератури;
- додатки (факультативно).

Об'єм курсової роботи повинен складати приблизно 20-25 аркушів машинописного тексту (комп'ютерної роздруківки), виконаного на стандартному папері для письма формату А4, не враховуючи додатків. У разі використання у тексті роботи додатків, висновків, пропозицій, запозичених з різних джерел, посилання на них обов'язкові. Теоретичні положення та висновки рекомендуються ілюструвати матеріалами опублікованої та неопублікованої практики. При цьому необхідно робити посилання на джерело, звідки вони взяті. Виконана курсова робота до встановленого терміну здається на кафедру та передається на рецензування науковому керівнику. Відгук керівника пишеться у вільній формі, але у ньому обов'язково слід відзначити переваги роботи, помилки та інші недоліки, відповідність роботи встановленим вимогам та вказати, допускається вона до захисту чи ні. Не допускаються до захисту роботи:

- виконані лише на основі підручника, без використання аналізу законодавчих та практичних матеріалів;
- виконані не самостійно, а шляхом переписування, без посилань на автора та джерело, або ті, що являють собою конспект підручника;
- ті, що не розкривають зміст теми та містять грубі помилки;
- недбало та неправильно оформлені.

Такі роботи повертаються для усунення недоліків. До повторно виконаної роботи студент зобов'язаний додати відгук керівника про первісно виконану роботу, щоб він міг перевірити, чи усунені відзначені ним недоліки. Студент захищає роботу перед науковим керівником або на наукових зборах кафедри чи студентського наукового товариства.

Дипломна робота – це випускна кваліфікаційна робота, що являє собою теоретичне або експериментальне дослідження однієї з актуальних тем у конкретній області знань, в якій випускник демонструє рівень оволодіння необхідними теоретичними знаннями та практичними навичками, які дозволяють

йому самостійно вирішувати професійні проблеми. Завданнями випускної дипломної роботи є:

- розвиток навичок самостійної роботи, одержаних протягом навчання, у проведенні наукового дослідження за темою;
- уміння самостійно розробляти конкретну наукову проблему;
- чітке розуміння стратегії у вирішенні досліджуваної проблеми, включаючи критичну оцінку літературних джерел та різних поглядів вчених та практиків;
- вміння докладно систематизувати дані, одержані з періодичної та спеціальної літератури, робити аргументовані висновки та пропозиції;
- узагальнення усього комплексу знань, одержаних під час навчання у вузі.

Під час обрання теми дипломної роботи необхідно враховувати:

- актуальність теми дослідження;
- практичну значимість;
- можливість використання у дипломній роботі конкретного фактичного матеріалу, зібраного протягом проходження виробничої та переддипломної практик.

Виконання дипломної роботи проходить такі етапи:

- вибір теми;
- вивчення літератури;
- складання плану;
- визначення методів дослідження;
- виконання практичної частини;
- робота над текстом та оформлення;
- підготовка до захисту та захист роботи.

Дипломна робота за своєю структурою складається з таких елементів:

- титульного аркуша;
- реферату;
- змісту;
- вступу;
- основної частини;
- висновків;
- переліку використаної літератури;
- додатків (якщо вони необхідні).

Об'єм дипломної роботи за умови технічного виконання (на друкарській машинці, комп'ютері тощо) не повинен перевищувати 60-70 сторінок (без додатків). Рукописний варіант дипломної роботи не допускається. Внутрішня структура може складатися із завдання з підготовки дипломної роботи, вступу, 2 – максимум 3 глав з 2–3 параграфами кожна, завершення у вигляді висновків та рекомендацій, бібліографій та додатків. Можлива інша структура. Наприклад, без глав та параграфів, а лише через розділи.

Приблизне розподілення об'єму дипломної роботи за розділами може бути такими:

1. Вступ – 5 % від загального обсягу.

2. Розділ 1 (Літературний огляд) – 20 %.
3. Розділ 2 (Матеріали та методи дослідження) – 20 %.
4. Розділ 3 (Результати та їх обговорення) – 50 %.
5. Завершення (Висновки) – 5 %.

Готова дипломна робота підписується виконавцем та здається науковому керівнику в термін, встановлений планом-графіком. Після її прочитання керівник складає на неї письмовий відгук. У ньому слід вказати позитивні та негативні сторони дипломного проекту за такою схемою:

- актуальність;
- новизна;
- теоретична та практична значимість проведеного дослідження;
- повнота висвітлення питань теми;
- використання літератури та практичного матеріалу;
- ступінь самостійності автора у розкритті теми;
- наявність пропозицій та рекомендацій, можливість їх впровадження до навчального процесу;
- відповідність оформлення роботи до встановлених правил;
- неточності, помилки, суперечливі моменти, зауваження за змістом та оформленням.

Дипломна робота (переплетена або скріплена затискачами типової теки) з письмовим відгуком керівника не менш ніж за 10 днів до захисту передається рецензенту для рецензування. Рецензентами, як правило, є наукові робітники, що працюють у відповідній галузі, висококваліфіковані практичні робітники, які мають вищу освіту.

Рецензія (відгук про наукову роботу) – це робота, у якій критично оцінюють основні положення і результати дослідження, що рецензується. Особливу увагу звертають на актуальність його теоретичних положень, доцільність та оригінальність застосованих методів дослідження, новизну та достовірність отриманих результатів, їх практичну корисність. У процесі складання рецензії звичайно дотримуються такої послідовності:

- обґрунтування необхідності (актуальність) теми дослідження;
- оцінка ідейного та наукового змісту (основна частина рецензії), мови, стилю;
- послідовність викладення результатів дослідження;
- оцінка ілюстративного матеріалу, обсягу дослідження та рукопису (рекомендації щодо скорочення або доповнення);
- загальні висновки;
- підсумкова оцінка дослідження.

Критика рецензента повинна бути принциповою, науково обґрунтованою, вимогливою, але водночас і доброзичливою, яка сприятиме покращенню дослідження.

Дипломна робота захищається студентом перед Державною комісією на відкритому засіданні. Процедура захисту така. Для викладання основних результатів дослідження автору надається 7–10 хв. У доповіді дипломник не повинен озвучувати чужі загальновідомі положення, визначення, а коротко викласти розуміння досліджуваної роботи, приділяючи особливу увагу результатам власного дослідження. У доповіді рекомендується відобразити:

- обґрунтування актуальності теми;
- характеристику об'єкта дослідження;
- перелік методів дослідження;
- опис результатів та їх коротке обговорення;
- висновки та пропозиції.

Зміст доповіді має бути проілюстрований. Ілюстративний матеріал повинен підтверджувати теоретичні та практичні висновки, подавати найбільш важливі цифри, оформлені у табличній, графічній або текстовій формах. Після закінчення доповіді члени комісії та присутні можуть ставити дипломнику питання за темою дипломної роботи. Відповіді повинні бути по суті заданих питань, короткими та аргументованими. Потім зачитують відгук керівника та рецензії (зауваження та основні висновки з них) і надають слово керівнику й рецензенту, які повідомляють свою думку щодо дипломної роботи. Рішення комісії про оцінку дипломних робіт та підсумки захисту приймаються на закритому засіданні простою більшістю голосів членів комісії.

ТЕМА 5. БУФЕРНІ РОЗЧИНИ

Для роботи з біологічним матеріалом використовуються різноманітні розчини. Кваліфіковане приготування кожного розчину ґрунтується на впевнених знаннях:

- фізико-хімічних властивостей розчинників та речовин, що розчиняються;
- вираження концентрації (відсоткова, молярна, моляльна, нормальна);
- математичного розрахунку.

Особливе місце в біології та медицині займають буферні розчини.

Буферні розчини (синонім: буферні суміші, буферні системи, буфери) — розчини з певною концентрацією водневих іонів, що містять сполучену кислотно-основну пару, що забезпечує стійкість величини їх водневого показника за незначних змін концентрації або у разі додавання невеликої кількості кислоти або лугу.

Розчини, здатні зберігати певну концентрацію іонів водню під час додавання до них кислот, лугів або розведенні водою, називають буферними. Звичайно буферну дію проявляють водні розчини слабких кислот та їх солей або слабких лугів та їх солей. Сильні кислоти та луги у воді дисоціюють практично повністю і не містять резервної кількості недисоційованих молекул.

Збереження постійного значення pH має велике значення для протікання усіх біохімічних процесів. Зміни pH середовища суттєво впливають на кінетику біохімічних реакцій, інтенсивність обміну речовин і, таким чином, мають життєво важливі наслідки для живих організмів. Серед усіх систем, які мають буферні властивості, у живих організмах найбільш важливими є фосфатна, гідрокарбонатна та білкова.

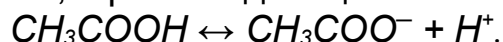
Лімфа, кров, сеча й інші біологічні рідини є буферними розчинами. Завдяки дії їх буферних систем підтримується відносна сталість водневого показника внутрішнього середовища, що забезпечує повноцінність метаболічних процесів. Найбільш важливою буферною системою є бікарбонатна система крові. Концентрація в крові бікарбонатів служить одним з основних показників кислотно-лужного стану організму. Цей показник дозволяє встановити характер порушення кислотно-лужної рівноваги у ряді патологічних процесів.

У лабораторній практиці буферні розчини використовують у тих випадках, коли те або інше дослідження може бути проведене лише за умов постійного значення pH (наприклад, визначення активності ферментів, вивчення кінетики ферментативних реакцій, електрофоретичний поділ білкових сумішей і ін.) і як стандарти для визначення pH різних розчинів, у т.ч. біологічних рідин.

Механізм дії буферної системи

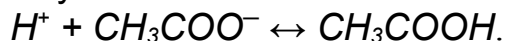
Розглянемо механізм дії буферної системи на прикладі водного розчину оцтової кислоти та її солі ацетат натрію. Ацетат натрію – потужний електроліт, який практично повністю дисоціює на іон Na^+ та ацетат CH_3COO^- .

Оцтова кислота – слабка, в розчині дисоціює мало:



За наявності добре дисоційованої солі, завдяки високій концентрації іонів CH_3COO^- , дисоціація самої кислоти пригнічується і стає ще меншою. Саме тому, оцтова кислота в такому розчині майже повністю знаходиться в молекулярній формі. Практично всі іони CH_3COO^- у розчині з'являються внаслідок дисоціації ацетату натрію.

Якщо до такого розчину додати сильну кислоту, то вільні іони H^+ цієї кислоти зв'яжуться з іонами CH_3COO^- , що приведе до формування недисоціювальних молекул:



Рівновага цієї реакції значно зсунута у бік недисоційованої форми оцтової кислоти. Таким чином, після додавання кислоти концентрація іонів водню в розчині практично не зміниться. Звідси, значення pH розчину залишається незмінним.

Якщо до такого розчину додати гідроксид натрію (сильний луг), іони OH^- будуть зв'язуватись з іонами H^+ , що веде до формування молекул

води. Оцтова кислота при цьому буде дисоціювати, і концентрація іонів водню буде компенсована до початкового значення.

Кількісною характеристикою буферних властивостей розчину є буферна ємність. **Буферна ємність** обумовлена кількістю грам-еквівалентів кислоти або лугу, що потрібні для додавання до 1 л (1 мл) буферного розчину, для того щоб змінити рН цього розчину на одиницю.

Експериментально буферну ємність визначають так:

- вимірюють рН буферного розчину;
- до 10 мл буферного розчину додають 1 мл 0,1 н розчину NaOH або HCl ;
- знову вимірюють рН буферного розчину;
- буферну ємність розраховують за формулою:

$$\beta = NV_1 / (pH_1 - pH_0) \cdot V_0$$

де V_0 – об'єм буферного розчину, мл;

V_1 – об'єм доданої кислоти або лугу, мл;

N – нормальність кислоти або лугу;

pH_0 – початкове значення рН буферного розчину;

pH_1 – значення рН буферного розчину після додавання кислоти або лугу.

Буферна ємність залежить від концентрації компонентів буферної системи, а також від співвідношення концентрацій солі та кислоти. Найбільша буферна ємність досягається для розчинів, у яких концентрація солі дорівнює концентрації слабкої кислоти, а також $pH = pK_a$.

Потенціометричне визначення рН

Концентрація іонів водню та гідроксильних груп є важливим фактором, який контролює каталітичну дію ферментів.

Кислотність і лужність розчинів можна вимірювати колориметричними методами, універсальними індикаторами, буферним методом.

Найбільш точним методом є метод потенціометричного визначення рН розчинів, що заснований на вимірюванні електрорушівної сили (ЕРС) елемента, складеного із електрода порівняння (з відомим потенціалом) та вимірювального електрода, потенціал якого визначається концентрацією іонів водню у дослідному розчині.

Метод потенціометричного титрування належить до електрохімічних методів. Цей метод полягає в тому, що точку еквівалентності у ході титрування визначають за різкою зміною потенціалу індикаторного електрода. Якщо металічну пластинку, наприклад цинку, занурити в дистильовану воду, то під дією полярних молекул води іони цинку відриваються від кристалічної решітки металу і переходять у розчин. Внаслідок втрати іонів металічна пластина набуває від'ємного заряду, а оточуючий шар полярного розчинника набуває позитивного заряду за рахунок катіонів, що утримуються електростатичною взаємодією з від'ємним зарядом металу. На межі між металом і розчином формується

подвійний електричний шар з характерним певним стрибком потенціалу. Такий стрибок потенціалу отримав назву електродного.

Величина електродного потенціалу за умов встановлення стану рівноваги є рівноважним електродним потенціалом і визначається за рівнянням Нернста:

$$\varphi = \varphi_0 + (R \cdot T / n \cdot F) \cdot \ln C_{Me},$$

де φ – потенціал металічного електроду, що відповідає кількості іонів металу в розчині;

φ_0 – потенціал того ж електроду в розчині з концентрацією іонів, що дорівнює одиниці (нормальний потенціал);

C_{Me} – концентрація іонів металу, або їх активність;

R – газова стала;

T – абсолютна температура;

F – число Фарадея;

n – заряд іонів металу.

При температурі 25° С та відповідних значеннях R і T , а також враховуючи коефіцієнт переходу від натурального до десяткового логарифма, рівняння Нернста набує вигляду:

$$\varphi = \varphi_0 + (0,058 / n) \cdot \lg C_{Me}.$$

Для потенціометричного титрування складають замкнутий ланцюг з індикаторного електроду, зануреного в дослідний розчин, та електроду порівняння. У процесі потенціометричного титрування залежно від концентрації іонів в розчині проходять зміни рівноважного потенціалу індикаторного електроду відносно даного катіона або аніона. Величину потенціалу індикаторного електроду визначають відносно неполяризованого електроду, потенціал якого не змінюється в ході титрування і слугує як величина для порівняння з потенціалом індикаторного електроду. Такі електроди називають електродами порівняння або стандартними.

Кондуктометричний метод

Кондуктометричний метод аналізу заснований на вимірюванні електричної провідності розчинів. Електрична провідність (g) розчину – це величина, що обернено пропорційна його опору (R).

Провідність розчину g залежить від концентрації, рухомості іонів і температури. Провідність додатково залежить від відстані між електродами (S) та їх площі (L):

$$g = k \cdot (S / L)$$

де k – константа посудини.

Питома провідність відповідає провідності 1 м^3 розчину, що знаходиться між електродами з площею 1 м^2 і відстанню між ними 1 м . Питома провідність є величиною, яка обернено пропорційна питомому опору:

$\chi = k / R$ і визначається у сіменсах на метр (См/м).

У цьому випадку k – стала електролітичного блока.

Поляррографічний метод

Поляррографічний метод заснований на вимірюванні та аналізі графіків залежності сили струму від величини зовнішнього електричного поля під час електролізу сполук. Автоматична ситема запису виконується за допомогою приладу, що називається поляррографом. Цей метод дозволяє визначити різні катіони та аніони, амінокислоти, вітаміни, нуклеїнові кислоти, білки та їх функціональні групи, дослідити ферментативну активність, взаємодію ферментів з коферментами.

Поляррографічний аналіз полягає у проведенні електролізу дослідної речовини у розчині. Для проведення електролізу використовують ртутні електроди. Внаслідок різної поверхні електродів (робоча поверхня катода має бути в декілька тисяч разів меншою за поверхню анода) на катоді проходить концентраційна поляризація за рахунок відновлення дослідної речовини. На аноді щільність струму незначна, тому величина його потенціалу практично не змінюється.

ТЕМА 6. СУБКЛІТИННЕ ФРАКЦІОНУВАННЯ

Для глибокого вивчення функцій кожної з органел необхідно насамперед одержати ці органели у відносно чистому вигляді, так, щоб їх препарат був якнайменше забруднений іншими органелами. Процес, за допомогою якого цього звичайно вдається досягти, називається субклітинним фракціонуванням і складається із трьох етапів: екстракції, гомогенізації та центрифугування. Більшість перших робіт у цій галузі виконано на печінці щура.

Екстракція. Першим кроком у процесі виділення специфічних органел (або молекул) є їх екстрагування із клітин, у яких вони перебувають. Більшість органел і біомолекул (зокрема, білки) досить лабільні (нестійкі) і легко втрачають біологічну активність. Тому їх потрібно екстрагувати в м'яких умовах (у водяних розчинах, уникаючи екстремальних значень pH , осмотичного тиску, а також високих температур). Більша частина операцій з виділення органел проводиться при $0-4^\circ \text{ C}$ (у холодній кімнаті або на льоду). При кімнатній температурі може спостерігатися значне зменшення

активності, частково внаслідок дії різних гідролітичних ферментів (протеаз, нуклеаз і т.д.), що вивільняються внаслідок руйнування клітин. Звичайно для екстракції органел використовують 0,25 М розчин сахарози (ізоосмотичний розчин), що містить іони K^+ і Mg^{2+} у концентрації, близькій до фізіологічного; рН розчину доведений до 7,4 соляно-кислим трис-буфером (трис [гідроксиметил]-амінометангідрохлорид) у концентрації 0,05 М. Не всі розчинники забезпечують настільки ж м'які умови екстракції, як вказаний буфер; наприклад, для екстракції ліпідів і вуглеводів використовують органічні розчинники.

Гомогенізація (від грецьк. *homogenus* – однорідний) – створення стійкої в часі однорідної (гомогенної) структури у дво- або багатозфазовій системі шляхом ліквідації концентраційних мікронеоднорідностей, що утворюються у ході змішування взаємно нерозчинних речовин (вода-масло, етиловий спирт-ртуть).

Техніка гомогенізації

Фізичні методи. Використовуються різні технічні рішення гомогенізації, але найбільш поширеним є перемішування тканини з певним об'ємом буферу швидкообертним ротором диспергатора.

Інший спосіб – прокачування під тиском до сотень і тисяч атмосфер через отвір голівки гомогенізатора, що виникають при цьому гідродинамічні сили дроблять кульки жиру на більш дрібні.

Застосовують також механічне перемішування з високими значеннями градієнта зрушення; кавітацію, що створюється в середовищі за допомогою високошвидкісного механічного перемішування або ультразвуку.

Хімічні методи:

- використання поверхнево-активних речовин;
- використання хаотропних агентів.

Центрифугування

Частки в розчині осаджуються (седиментація), коли їх щільність вища щільності розчину, або спливають (флотація), коли їх щільність нижча щільності розчину. Чим більша різниця в щільності, тим швидше йде розподіл часток. Коли щільності часток і розчину однакові (ізопікнічні умови), частки залишаються нерухомими. За незначної різниці в щільності частки можна розділити тільки в центрифугі, що створює відцентрову силу, яка у багато разів перевищує силу земного тяжіння. У ході кожної стадії центрифугування утворюються осад і надосадова рідина (супернатант).

Ротори. Відцентрова сила в центрифугі, що по суті створюється прискоренням, звичайно виражається числом, кратним прискоренню вільного падіння g ($g = 9,81 \text{ м/с}^2$). Величини до 10000g одержують за допомогою простої настільної центрифуги, високошвидкісні рефрижераторні центрифуги дозволяють досягти 50000g, а ультрацентрифуги, що працюють із охолодженням і у вакуумі, – 500000g. Існують два типи роторів – **кутові** й вільнопідвішені, так звані **бакет-**

ротори. Останні використовуються звичайно у високошвидкісних центрифугах і ультрацентрифугах.

Швидкість седиментації частки (v) залежить від кутової швидкості (ω), ефективного радіуса ротора $r_{\text{эфф}}$ (відстань від осі обертання) і седиментаційних властивостей часток.

Седиментаційні властивості частки характеризуються коефіцієнтом седиментації S і виражаються в одиницях Сведберга ($1 S = 10^{-13}$ с). Величина S може коливатися в широких межах. Для порівняння коефіцієнтів седиментації в різних середовищах їх звичайно корегують за щільністю й в'язкістю води при 20° (S_{20W}).

Коефіцієнт седиментації залежить від молекулярної маси (M) частки, її форми (коефіцієнт тертя f), парціального питомого об'єму Pv (величина, зворотна щільності частки).

Центрифугування в градієнті щільності

Макромолекули або органели, що незначно розрізняються за розміром або щільністю, можна розділити центрифугуванням у градієнті щільності. Для цих цілей застосовуються два методи.

У зонального центрифугування аналізована проба (наприклад, білки) нашаровується тонким шаром поверх буферного розчину. У процесі центрифугування частки проходять через розчин, тому що їх щільність вища щільності розчину. Швидкість руху залежить від маси й форми часток. Центрифугування припиняють перш ніж частки досягнуть дна центрифугальної пробірки. Потім дно проколюють і збирають ряд фракцій, що містять різні частки. Стабільність градієнта щільності в процесі центрифугування досягається завдяки розчинам вуглеводів або колоїдного силікагелю, концентрація яких зростає від поверхні до дна пробірки. Градієнт щільності перешкоджає утворенню конвекційних потоків, що знижують якість поділу.

У ході **ізопікничного центрифугування** пробу (наприклад, ДНК, РНК або віруси) рівномірно розподіляють у повному обсязі розчину (звичайно $CsCl$). У цьому випадку поділ триває значно довше, ніж за зонального центрифугування. Градієнт щільності створюється за рахунок седиментації й дифузії. Згодом кожна частка потрапляє в ділянку, що відповідає її власній плавучій щільності. Центрифугування припиняють, коли встановлюється рівновага. Отримані фракції аналізують, використовуючи відповідну вимірювальну техніку.

Ультрацентрифугування. Цей метод заснований на різній швидкості седиментації білкових молекул у розчинах з різним градієнтом щільності (сахарозний буфер або хлорид цезію) (рис. 1).

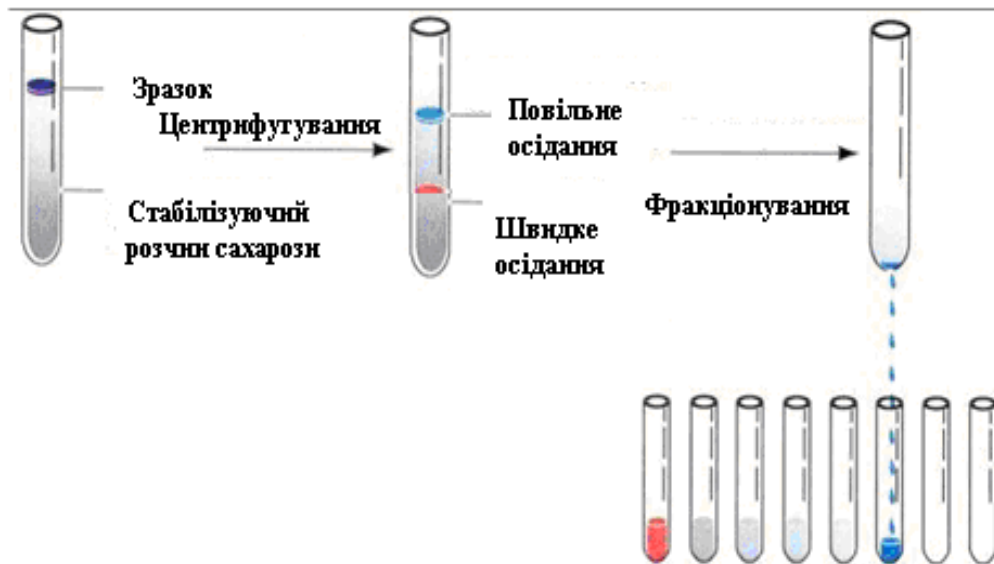


Рис. 1. Етапи ультрацентрифугування

ТЕМА 7. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Метод електрофорезу заснований на різній швидкості міграції заряджених молекул (білків, пептидів, ДНК, РНК) в електричному полі залежно від загального заряду. Носіями для електрофорезу можуть слугувати гелі, ацетатцелюлоза, агар. Поділювані молекули рухаються в гелі залежно від розміру: ті з них, які мають більші розміри, будуть затримуватися під час проходження через пори гелю. Менші молекули будуть зустрічати менший опір і відповідно рухатися швидше. У результаті, після проведення електрофорезу, більші молекули будуть перебувати ближче до старту, ніж менші.

Методом електрофорезу можна розділити білки за молекулярною масою. Для цього використовують електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності додецилсульфата натрію (ДСН). ДСН є дифільною речовиною й містить заряджену й гідрофобну групу. Білки зв'язуються із ДСН своїми гідрофобними радикалами й при цьому денатурують (рис. 2).

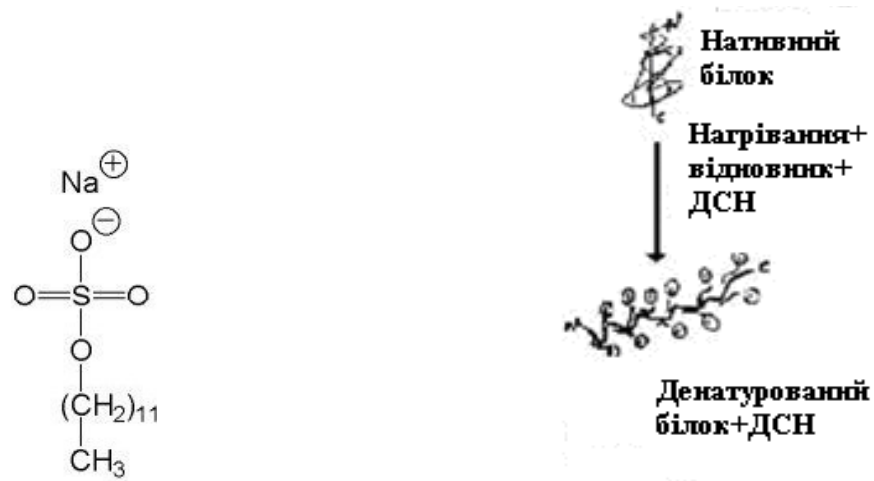


Рис. 2. Підготовка білків до електрофорезу за допомогою додецилсульфата натрію

Таким чином, білки вирівнюються за формою й зарядом. Після цього рухливість білка під час електрофорезу залежить тільки від його молекулярної маси. Приклад електрофоретичної камери наведений на рис. 3.

Ізоелектрофорез – один з сучасних методів розподілу молекул, заснований на їх поведінці в електричному полі. Під час ізоелектричного фокусування між анодом і катодом створюється градієнт pH . Заряджені молекули, що перебувають або внесені в систему, рухаються відповідно до їх фактичного заряду в напрямку протилежному зарядженому електроду. Якщо молекули амфотерні, то у ході переміщення в градієнті pH їх сумарний заряд буде безупинно змінюватися доти, доки вони не досягнуть положення, де він стане рівним нулю. Значення pH виявиться рівним ізоелектричній точці молекули. Якщо градієнт pH стабільний, то молекули з однаковими pH будуть залишатися сконцентрованими у вузькій ділянці.

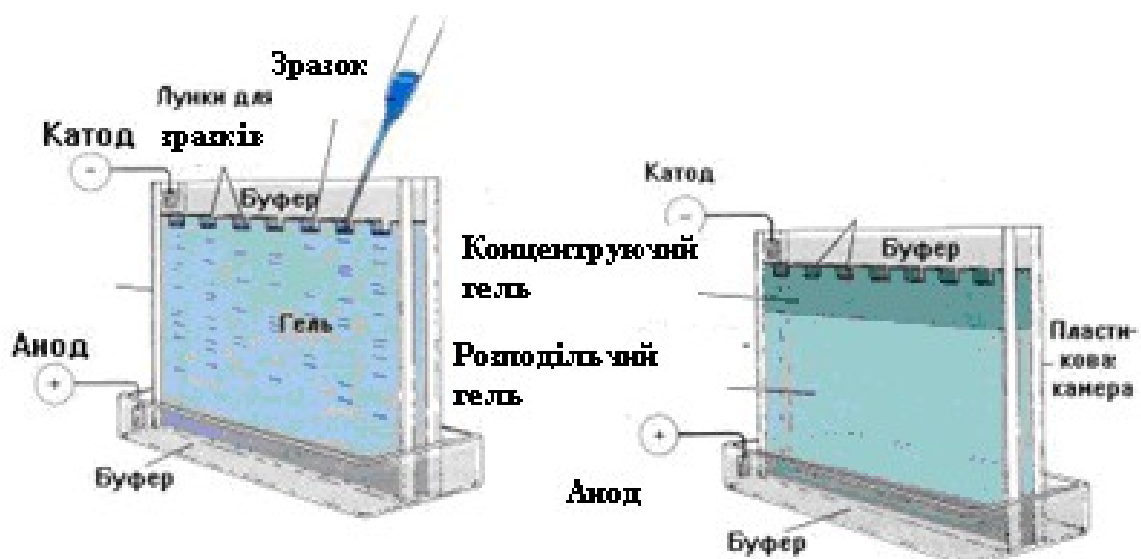


Рис. 3. Схема електрофоретичної камери

ТЕМА 8. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Хроматографія – найбільш часто використовуваний аналітичний метод. Найновішими хроматографічними методами можна проаналізувати газоподібні, рідкі, тверді речовини з молекулярною масою від 1 до 10^6 дальтон. Хроматографічний метод аналізу був розроблений російським ботаніком М.С. Цветом у 1903 р. У перших своїх дослідах М.С. Цвет встановив, що зелений пігмент хлорофіл, який до цього вважався однорідним, насправді складається з декількох речовин. Під час пропускання екстракту зеленого листка через колонку, заповнену порошком крейди, і промиванні петролейним ефіром він отримав декілька забарвлених зон, що, без сумніву, свідчило про наявність в екстракті декількох речовин. У подальшому це було доведено іншими дослідниками. Цей метод отримав назву *хроматографія* (від грец. “хроматос” – колір), хоча ним самим було вказано на можливість розділення і незабарвлених речовин.

Компоненти суміші, що аналізується (сорбати), разом з рухомою фазою пересуваються вздовж стаціонарної фази. Її зазвичай поміщують в скляну або металеву трубку, яка отримала назву колонки. Залежно від сили взаємодії з поверхнею сорбенту (за рахунок адсорбції чи якогось іншого механізму) компоненти будуть переміщуватись вздовж колонки з різною швидкістю. Одні компоненти залишаться у верхньому шарі сорбенту, інші, які менше взаємодіяли з сорбентом, опиняться в нижній частині колонки, а деякі взагалі залишать колонку з рухомою фазою (такі компоненти отримали назву тих, що не утримуються, а час їх утримання визначає мертвий час колонки). Таким чином, відбувається швидке розділення складних сумішей компонентів. У процесі переміщення вздовж колонки рухома фаза зустрічає все нові й нові шари сорбенту, що забезпечує багатократність актів сорбції – десорбції компонентів, що розділяються. Цим обумовлена значно більша ефективність хроматографічного розділення порівняно зі статичними методами сорбції та екстракції.

Хроматографія – це фізико-хімічний метод розділення і визначення речовин, який ґрунтується на розподілі компонентів між двома фазами, нерухомою та рухомою. Нерухомою (стаціонарною) фазою слугує тверда пориста речовина чи плівка висококиплячої органічної рідини, нанесеної на тверду речовину. Рухома фаза являє собою рідину чи газ, який протікає через нерухому фазу.

Різноманітні методи хроматографії можна класифікувати за агрегатним станом фаз, способом їх відносного переміщення, апаратурним оформленням процесу тощо.

За агрегатним станом фаз хроматографічні методи, зазвичай, класифікують згідно з такими критеріями (табл. 1):

Таблиця 1

Класифікація методів хроматографії

Рухома фаза	Нерухома фаза	
	Газоподібна	Рідка
Тверда	Газо-адсорбційна	Рідинно-адсорбційна Іонобмінна Осадова
Рідка	Розподільна газо-рідинна	Розподільна рідинно-рідинна

За механізмом взаємодії сорбента і сорбата можна виділити декілька видів хроматографії:

- адсорбційна хроматографія, яка ґрунтується на різниці в адсорбції речовин твердим сорбентом;
- розподільна хроматографія – на різниці в розчинності речовин, що розділяються в нерухомій фазі (газова хроматографія) та на різниці в розчинності речовин в рухомій чи нерухомій рідких фазах;
- іонообмінна хроматографія – на різній здатності речовини до іонного обміну;
- ексклюзивна хроматографія – на різниці в розмірах і формах молекул речовин, що розділяються;
- афінна хроматографія – на специфічних взаємодіях, характерних для деяких біохімічних та біологічних процесів.

За технікою виконання розрізняють:

- колонкову хроматографію (розділення відбувається на спеціальних колонках);
- площинну хроматографію, коли розділення відбувається на спеціальному папері (паперова хроматографія) чи у тонких шарах сорбента (тонкошарова хроматографія).

За метою хроматографування виділяють:

- аналітичну хроматографію (якісний та кількісний аналіз);
- препаративну (для отримання речовин у чистому вигляді та для концентрування й виділення мікродомішок);
- промислову (виробничу, для автоматичного управління процесом).

За способом відносного переміщення фаз розрізняють:

- фронтальну;
- елюентну;
- витіснявальну хроматографію.

У хроматографії рухомих фазу, яку вводять у шар нерухомих фаз, називають **елюентом**, а рухомих фазу, яка виходить з колонки і містить компоненти, що розділяються, – **елюатом**.

Хроматографічні методи розділення набули визнання і застосування в аналізі різних органічних молекул. Ці методи мають безліч модифікацій, що розширює галузь їх застосування і дозволяє з однаковим успіхом працювати як з великою (грами), так і з малою (пікограми) кількістю початкового матеріалу. Усі хроматографічні системи складаються, як правило, з двох фаз. Однією з них є

нерухома фаза, яка буває твердою, рідкою або сумішшю рідкої та твердої фаз. Друга фаза може бути рідкою або газоподібною.

Гель-хроматографія є одним із методів розділення, очистки та аналізу органічних сполук. У ході гель-хроматографії речовини розділяються в основному за розміром, формою та молекулярною масою, а не за хімічними властивостями або розчинністю. За допомогою гель-хроматографії можна визначати її молекулярну масу сполук. Нанесені на колонку сполуки (в вигляді розчину в рухомій фазі) ведуть себе по-різному по відношенню до гранул гелю. Це пов'язано з тим, що крупинки сорбенту мають пори, в які молекули малих розмірів та молекулярних мас проникають і затримуються в них, а отже, затримуються сорбентом; речовини ж, розмір яких перевищує розмір пор сорбенту не проникають всередину гранул і рухаються відносно швидко (молекулярні сита) (рис. 4).

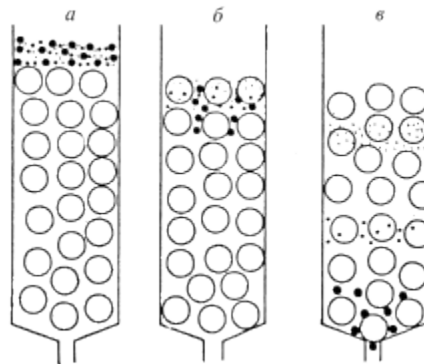
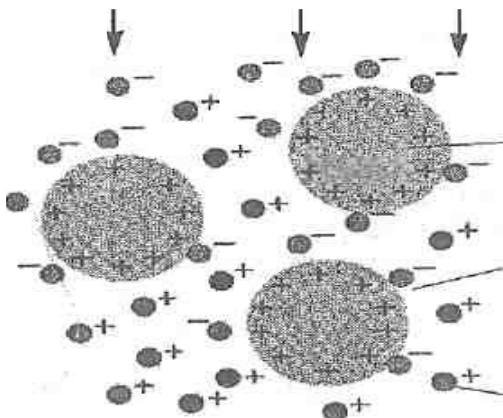


Рис. 4. Схематичне зображення розділення речовин метом гель-проникаючої хроматографії:

а – начало розділення; б – розділення; в – кінець розділення

Принцип **іонообмінної хроматографії** полягає в тому, що заряджені молекули зворотно адсорбуються на іонообміннику, так що молекули можуть зв'язуватися і виділятися залежно від іонного складу середовища. Розділення на іонообмінниках зазвичай проводиться у дві стадії: спершу сполука, яку потрібно відокремлювати, зв'язується з іонообмінником в умовах утворення стабільного зв'язку, потім колонку промивають буфером з іншим значенням pH або з іншою іонною силою, внаслідок чого компоненти буфера конкурують із зв'язаною речовиною за зв'язувальний центр (рис. 5).



Зв'язані молекули, заряджені негативно

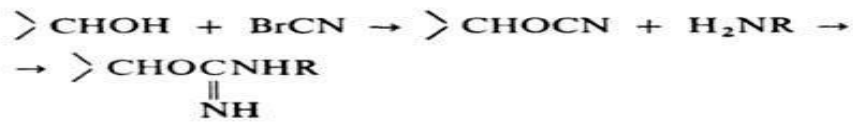
Вільні молекули, заряджені позитивно

Рис. 5. Схематичне зображення розділення речовин методом іонообмінної хроматографії

Афінна хроматографія (від лат. *affinis* – родинний) – (біоспецифічна хроматографія, хроматографія за спорідненістю) метод очищення й поділу білків, заснований на їх вибірковій взаємодії з лігандом, ковалентно пов'язаним з інертним носієм.

Як ліганди використовують сполуки, що взаємодіють з речовинами, які розділяються. Така взаємодія заснована на біологічній функції останніх. Так, у процесі розділення ферментів (для чого переважно й застосовується афінна хроматографія) лігандами виступають їх субстрати, інгібітори або коферменти. Головна особливість, що обумовлює високу ефективність афінної хроматографії, полягає в тому, що розділення засноване на розходженні специфічних функціональних властивостей, а не фізико-хімічних ознак молекули (заряду, форми й розміру), що відрізняють даний фермент від безлічі інших біополімерів.

Нерухома фаза афінної хроматографії являє собою спеціально одержаний сорбент, побудований звичайно за схемою: носій – поєднувальна ланка (спейсер) – специфічний ліганд. Носієм найчастіше є сефарозоутворююча агароза, що має поперечні зшивки. Приєднання до неї ліганду або спейсера, що містять, як правило, аміногрупу, здійснюється після активації сефарози бромціаном:



Уміст ліганду коливається від 0,1 до 10 мкмоль на 1 мл вологого сорбента. Сефароза, однак, малостійка до дії ряду хімічних речовин і мікроорганізмів.

Адсорбційна і розподільна хроматографія ґрунтуються на явищі полярності. **Адсорбент**— тверда речовина, здатна утримувати на своїй поверхні молекули завдяки великій кількості дрібних пор. На відміну від іонообмінних смол притягування молекул до поверхні адсорбенту в ідеальних умовах не є електростатичним. Сорбція речовин специфічна, що дозволяє вибірково адсорбувати одну з досліджуваних речовин із суміші. В основі розділення методом адсорбційної хроматографії лежать відмінності ступеня адсорбції даних речовин адсорбентом і розчинності їх у відповідному розчиннику. Ці властивості визначаються молекулярною структурою сполуки.

Адсорбційну хроматографію проводять на колонці, або на спеціальних пластинах (тонкошарова хроматографія). Колонку заповнюють адсорбентом і на нього наносять суміш речовин, що розділяються. Розділення здійснюється за рахунок того, що речовини з вищим ефективним коефіцієнтом розподілу просуваються по колонці з більшою швидкістю, відділяючись при цьому від речовин з нижчим коефіцієнтом. Якщо досліджувані сполуки забарвлені, то під час розділення можна бачити їх рух по колонці у вигляді забарвлених смуг. Якщо фракції не забарвлені, то весь матеріал, що виходить з колонки, збирають фракційно, а потім аналізують. Ефективність розділення залежить від природи адсорбенту. Зазвичай застосовують кремнієву кислоту, оксид алюмінію, карбонат кальцію, карбонат цинку, оксид магнію.

За **тонкошарової хроматографії** (ТШХ) шар адсорбенту наносять на скляні пластинки. На відміну від класичної хроматографії, адсорбенти ТШХ містять зв'язуючі агенти, наприклад сульфат кальцію. Адсорбент наноситься у вигляді кашоподібної суспензії, потім пластини висушують при 100—120°C. Проби у вигляді плями наносять на пластинку за допомогою мікропіпетки на відстані 2,5 см від нижнього краю й бічних сторін. Розділення проводять в спеціальній камері, на дно якої наливають розчинник шаром 1,5 см, потім закривають скляною кришкою й залишають на 1 год для насичення камери парами розчинника. Після досягнення рівноваги знімають кришку і хроматографічну пластинку поміщують у камеру. Для цього її встановлюють вертикально так, щоб місце нанесення проби було вище рівня розчинника. Камеру знову накривають кришкою, розчинник піднімається вгору по пластинці, таким чином відбувається розділення. Багато фірмових адсорбентів для ТШХ містять флуоресцентні барвники. Після розділення пластинку оглядають в ультрафіолетовому світлі, і окремі компоненти проявляються на них у вигляді синіх, зелених або темних плям.

ТЕМА 9. ЕТАПИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕРВИННОЇ СТРУКТУРИ БІЛКІВ І ПЕПТИДІВ

Виділення білка з біологічного матеріалу засноване на його фізико-хімічних властивостях. Найчастіше для цих цілей використовують кислотно-основні властивості білків (амфотерність, заряд молекули, ізоелектрична точка).

Від заряду білкових молекул залежить їх:

- розчинність;
- електрофоретична рухливість;
- структура й біологічна активність.

У ході розчинення у водному середовищі на поверхні білкової молекули формується гідратна оболонка. **Стійкість білка в розчині** залежить:

- 1) від заряду білкової молекули;
- 2) наявності гідратної оболонки;
- 3) молекулярної маси білка.

Для виділення нативних білків (без зміни просторової структури) з біологічного розчину застосовують методи:

- висолювання (осадження солями лужноземельних металів: хлорид натрію, сульфат амонію); не порушується первинна структура білка;
- осадження (використання водовідбираючих речовин: спирт або ацетон при низьких температурах, близько -20°C). Під час застосування цих методів білки втрачають гідратну оболонку й випадають в осад у розчині.

Денатурація — порушення просторової структури білків. Може бути оборотна (структура білка відновлюється після усунення денатурувального агента) або необоротна (просторова структура молекули не відновлюється, наприклад, у ході осадження білків мінеральними концентрованими кислотами, солями важких металів).

Амінокислотний склад білка можна встановити за допомогою кольорових реакцій, обумовлених наявністю в протеїнах специфічних амінокислотних груп. Для встановлення якісного і кількісного складу білка з ним потрібно провести гідроліз.

Гідроліз є важливим методом дослідження білків. Розрізняють кислотний, лужний і ферментативний гідролітичні шляхи. Зазвичай в організмі гідроліз проходить ферментативним шляхом завдяки дії протеолітичних ферментів. Незважаючи на спосіб, спочатку білок розпадається на високомолекулярні фрагменти, потім на низькомолекулярні пептиди і наприкінці – на окремі амінокислоти. Завершення гідролізу збігається з часом, коли зростання кількості карбонільних та амінних груп зупиняється та біуретова реакція стає від'ємною. В отриманому гідролізаті білка визначають окремі амінокислоти хроматографічним методом завдяки відмінності їх фізико-хімічних властивостей.

Нінгидринова реакція

Принцип методу. Нінгідрінова реакція характерна лише для α -амінокислот. Під час нагрівання з нінгідріном α -амінокислоти окислюються і розпадаються на альдегід, оксид карбону та аміак. Аміак, який виділяється в ході реакції, реагує з молекулами нінгідрину та продуктом цієї реакції – дикетооксигидринденом. Така реакція веде до формування речовини, забарвленої в інтенсивний фіолетово-синій колір. Нінгідрінова реакція використовується для кількісного визначення α -амінокислот колориметричним і хроматографічним методами.

Ксантопротеїнова реакція

Принцип методу. Ксантопротеїнова реакція характерна для ароматичних амінокислот, у яких під дією азотної кислоти бензольне ядро нітрується з формуванням нітросполук, забарвлених у жовтий колір. З додаванням аміаку забарвлення переходить в помаранчевий колір. Реакція має високу чутливість.

Встановлення послідовності білка

I. Визначення N-кінцевої амінокислоти (АК)

1. Метод Сенгера (ФДНБ – фтординітробензол – зв'язується з N-кінцем з утворенням сполуки жовтого кольору).
2. Метод Едмана (використається ФІТЦ – фенілізотіоціанат, що також зв'язується з N-кінцевою АК з утворенням сполуки жовтогарячого кольору).
3. Реакція N-кінця АК з дансілхлоридом з утворенням флуоресціюючого з'єднання.
4. Ферментативний метод (використання амінопептидаз – ферментів, які вибірково відщеплюють N-кінцеві АК, наприклад, аланінова амінопептидаза).

II. Визначення C-кінцевої АК

1. Метод Акабори (гідразин руйнує всі пептидні зв'язки й реагує з усіма АК, крім кінцевої; кінцеву АК визначають після обробки суміші ФДНБ).
2. Ферментативний метод (карбоксипептидаза А відщеплює ароматичні C-кінцеві АК, карбоксипептидази В – основні C-кінцеві АК).

III. Визначення АК-послідовності

Для визначення послідовності використовують прилад – секвенатор, запропонований Едманом.

Обмежений гідроліз

Обмежений гідроліз проводять за допомогою пептидаз, що розщеплюють поліпептидний ланцюг у певних ділянках. Отримані фрагменти аналізують і визначають їх локалізацію у загальній послідовності.

Аналіз гомологічних білків

Гомологічні білки – білки, які виконують ту саму функцію, але розрізняються за первинною структурою (наприклад, локалізовані в різних органах або утворюються унаслідок патологічних станів). Наприклад, HbA (містить Glu), HbS (містить Val) у разі серповидноклітинної анемії.

Метод пептидних карт (відбитків пальців), запропонований Інгремом, включає такі етапи:

- 1) об'єкти аналізованих білків розщеплюють на фрагменти (пептиди);
- 2) суміш пептидів кожного білка наносять у вигляді плями на аркуш хроматографічного паперу;
- 3) проводять електрофорез у горизонтальному напрямку;
- 4) проводять розподільну хроматографію у вертикальному напрямку;
- 5) отримані карти фарбують і порівнюють;
- 6) пептидні плями, що розрізняються виділяють і аналізують.

ТЕМА 10. ЗАГАЛЬНИЙ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИЙ ПІДХІД, ЗАСТОСОВУВАНИЙ У БІОХІМІЇ

Цей підхід складається із трьох частин: 1) виділення біомолекул і органел, що перебувають у клітині; 2) визначення структури біомолекул; 3) використання різних препаратів для аналізу функцій біомолекул і їх метаболізму (тобто процесів синтезу й розпаду).

На сьогодні існує багато методів, придатних для аналізу компонентів, які перебувають у клітинних екстрактах і інших препаратах, а саме:

- фракціонування солями (наприклад, осадження із сульфатом амонію);
- хроматографія (паперова, іонообмінна (аніоно- і катіонообмінна), афінна, тонкошарова, газо-рідинна, рідинна під високим тиском, гель-фільтрація);
- електрофорез (високовольтний, на папері, в агарозі, ацетатцелюлозі, крохмальному гелі, поліакриламіді, поліакриламіді в присутності додецилсульфата натрію);
- ультрацентрифугування.

Для одержання більшості біомолекул у чистому вигляді, як правило, необхідно послідовно застосовувати кілька методів. Подробиці про застосування кожного з методів можна знайти у відповідних посібниках.

Важливо мати на увазі, що прогрес у біохімії залежить від розробки нових методів аналізу, очищення й визначення структури. Наприклад, у галузі біохімії ліпідів відбувся дійсний переворот після введення в практику газо-рідинної й тонкошарової хроматографії. Аналіз мембранних і багатьох інших білків був у край утруднений доти, доки не з'явився метод електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфата натрію (ДСН-ПААГ): застосування додецилсульфата натрію приводить до солюбілізації ряду білків, які раніше не вдавалося перевести в розчинний стан. Після цього вже можна проводити електрофорез.

Розробка методів клонування й секвенування (визначення послідовності мономерів) ДНК зробила справжню революцію у вивченні нуклеїнових кислот і взагалі в біології.

Визначення структури біомолекул

Після очищення біомолекул можна визначити їх структуру – необхідна умова успішного детального вивчення кореляції між структурою й функцією. Основні методи, використовувані для аналізу структури біомолекул:

- елементний аналіз;
- спектроскопія в УФ, видимій і інфрачервоній областях, ЯМР-спектроскопія;
- використання кислотного або лужного гідролізу для розщеплення досліджуваних молекул на компоненти;
- використання набору ферментів з відомою специфічністю для розщеплення досліджуваних молекул (наприклад, використання протеаз, нуклеаз, глікозидаз);
- мас-спектрометрія;
- специфічні методи секвенування (наприклад, білків або нуклеїнових кислот);
- рентгенівська кристалографія.

Ці методи повинні бути знайомі студентам, що вивчали органічну хімію. Специфічність дії ряду ферментів дозволяє використати їх як потужні інструменти для з'ясування структурних особливостей деяких біомолекул. Теоретичний і технічний прогрес, що дозволив підвищити роздільну здатність мас-спектрометрії і ЯМР-спектроскопії, сприяв тому, що ці методи стали широко застосовуватися для визначення структури молекул. Наприклад, у край складну структуру вуглеводних ланцюгів, що входять до складу деяких біомолекул, зокрема глікопротеїнів, у багатьох випадках удалося встановити за допомогою ЯМР-спектроскопії високого розділення. Найбільш детальну інформацію про структуру біомолекул дають методи рентгенівської кристалографії. Саме завдяки їх використанню була встановлена детальна структура різних білків і ферментів, а також відкрита подвійна спіраль ДНК.

Вивчення функцій і метаболізму біомолекул з використанням різних препаратів

Перші біохімічні дослідження людини й тварин проводилися на рівні цілого організму. Як приклад можна привести вивчення подиху й частки речовин, що потрапили в організм. Незабаром стало ясно, однак, що цілий організм занадто складний, щоб можна було одержати чіткі відповіді на різні питання. Багато проблем, що виникали у ході роботи з організмом, були усунуті після готування більше простих препаратів і вивчення їх *in vitro*.

Ієрархічна послідовність препаратів, використовуваних для вивчення біохімічних процесів

Дослідження на рівні **цілого організму** (*in vivo*) включають:

- 1) видалення органа (наприклад, гепатектомія);
- 2) зміна дієти (голодування, посилене харчування);
- 3) прийом ліків (наприклад, фенобарбіталу);
- 4) уведення токсичних речовин (наприклад, чотирихлористого вуглецю);
- 5) спостереження за твариною зі специфічними захворюваннями (наприклад, цукровим діабетом);
- 6) використання складних методів, таких, як ЯМР-спектроскопія й позитронно-емісійна томографія.

Дослідження **ізолюваного перфузованого органу** (*in situ*) проводять із застосуванням будь-якого органу.

Використання **тканинних зрізів** (*in situ, in vitro*) можливе також під час дослідження всіх органів та тканин.

Використання **цілих клітин** (*in vitro*) в культурах є незамінним об'єктом у багатьох галузях біології та медицини. Особливо це стосується клітин крові, які відносно легко виділяються.

Використання **гомогенату** (*in vitro*):

- дозволяє працювати з безклітинними препаратами;
- дає можливість додавати або видаляти (шляхом діалізу) різні сполуки й спостерігати за наслідками;
- шляхом центрифугування уможливорює подальше субфракціонування, що дозволяє одержати індивідуальні клітинні органели.

Дослідження **ізолюваних клітинних органел** широко застосовується для вивчення функцій мітохондрій, ендоплазматичного ретикулума, рибосом і т.д.

Субфракціонування органел широко застосовується, наприклад, у ході вивчення функцій мітохондрій. Отримані фракції подальше застосовуються для **виділення й характеристики метаболітів і ферментів**, що є найважливішою частиною аналізу будь-якої хімічної реакції або метаболічного шляху

Клонування генів, що кодують ферменти й інші білки, на сьогодні стало звичайною процедурою. Виділення клонованого гена необхідно для вивчення деталей його структури й регуляції; дозволяє встановити амінокислотну послідовність білка, що ним кодується.

Дуже велику роль відіграло введення в біохімічну практику **ізотопів** у 1930-х рр. Раніше було дуже важко позначити біомолекули, щоб потім стежити за їх перетвореннями в ході метаболізму. У перших дослідженнях, насамперед Шонхеймера і його колег, для виконання багатьох біохімічних завдань використовувалися стабільні ізотопи ($2D$, $15N$), за долею яких далі стежили за допомогою мас-спектрометрії. Наприклад, синтезували певні амінокислоти, цукри й жирні кислоти, до складу яких вводили стабільні ізотопи, а потім додавали ці сполуки в їжу тваринам або до препаратів *in vitro*, щоб можна було стежити за їх метаболізмом (визначати час напівжиття, перетворення на інші біомолекули й т.д.). Саме таким способом

були з'ясовані багато аспектів метаболізму білків, вуглеводів і ліпідів. Стало ясно, що метаболізм – дуже активний процес: більша частина сполук у клітині постійно синтезується й розпадається, хоча швидкості цих процесів можуть сильно відрізнятись. Підсумовування всіх цих результатів дозволило Шонхеймеру сформулювати уявлення про “динамічну природу метаболізму”.

Дуже важливе значення мало подальше використання радіоактивних ізотопів і приладів, що дозволяють визначати їх кількість. Стабільні й радіоактивні ізотопи, широко застосовувані у ході роботи з біологічними системами, перераховані в табл. 2.

Таблиця 2.

Ізотопи, найбільш широко застосовувані в біологічних дослідженнях

Стабільні ізотопи	Радіоактивні ізотопи
^2D	^{15}N
^{18}O	^3H
^{14}C	^{32}P
^{35}S	^{35}Ca
^{125}I	^{131}I

Їх застосування відіграло вирішальну роль у розвитку ряду галузей біології. Багато досліджень простих і складних біомолекул *in vivo* і *in vitro* значною мірою спираються саме на використання ізотопів. Той прогрес, що був досягнутий останнім часом у секвенуванні нуклеїнових кислот і в розвитку радіоімунних методів для вимірювання дуже малих кількостей сполук у біологічних системах, також був обумовлений значною мірою застосуванням ізотопів.

Загальна стратегія вивчення біохімічних процесів

Метаболічний шлях – це сукупність реакцій, відповідальних за синтез складних сполук з більш простих і за розпад сполуки до кінцевих продуктів. Той або інший складний біохімічний процес або метаболічний шлях іноді проявляється на рівні цілого організму. Прикладом цього може служити скорочення м'язів. Ми знаємо, що глюкоза є джерелом енергії для людини й інших тварин, а це означає, що в організмі людини вона повинна розпадатися (піддаватися метаболізму) з виділенням енергії. Однак для того щоб одержати повне уявлення про специфіку метаболізму глюкози необхідно провести дослідження на різних рівнях.

Можливість артефактів не знімає абсолютної необхідності виділення й ідентифікації кожного компонента, що бере участь у біохімічному процесі, у чистому вигляді; без цього неможливо зрозуміти, як проходить процес на

молекулярному рівні. Важливо навчитися реконструювати процес *in vitro* шляхом систематичного підбору індивідуальних компонентів. Якщо після добору всіх компонентів системи процес все-таки не йде, це може означати відсутність якогось важливого компонента, що був пропущений у ході ідентифікації й не додавалася під час збірки. Завдяки досягнутим в останні роки успіхам у галузі технології (наприклад, у ЯМР-спектроскопії й позитронно-емісійній томографії) з'явилася можливість виявляти певні біомолекули на рівні обстеження цілих органів і стежити за зміною їх складу в часі. Це дозволяє аналізувати багато складних біохімічних процесів *in vivo*. Лише після того, як спостереження, виконані на різних рівнях, дадуть результати, що узгодяться між собою, можна з упевненістю говорити про реальні успіхи в розумінні досліджуваного біохімічного процесу. Якщо ж у процесі використання різних підходів виникнуть істотні розбіжності, варто шукати причину цих розбіжностей доти, доки не буде знайдене раціональне пояснення. Описане вище сполучення різних рівнів дослідження й різного роду препаратів може використатися для виявлення біохімічних змін у тварин, пов'язаних зі змінами метаболізму (наприклад, за обмеженого або посиленого харчування) або з певними захворюваннями (цукровий діабет, рак). Більша частина описаних вище методів і підходів застосовна для вивчення клітин або тканин людини в нормі й патології. При цьому необхідно ретельно стежити за тим, щоб використовувалися тільки свіжоприготовані препарати, а крім того, варто звертати особливу увагу на етичні питання, пов'язані із проведенням експериментів на людині.

ТЕМА 11. ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

Технологія полімеразної ланцюгової реакції (polymerase chain reaction, PCR) була впроваджена Кері Мюлліс у середині 1980-х рр., коли секвенування ДНК дало можливість розробки зовсім нових засобів для вивчення та аналізу генів. Головна проблема аналізу гена полягає в тому, що ген є дуже маленька одиниця в комплексі генома. Геном ссавців може складатися з більш ніж 100 000 генів. Багато засобів молекулярної біології використовувались для вирішення цієї проблеми, а саме: клонування ДНК та методи визначення специфічних послідовностей ДНК. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) змінила увесь підхід до вивчення гена, тому що дала можливість продукувати велику кількість копій специфічних послідовностей ДНК без пересортування та клонування.

Полімеразна ланцюгова реакція застосовує властивості ДНК до реплікації. ДНК-полімераза використовує окремих ланцюг ДНК як тимчасову матрицю для синтезу комплементарного нового ланцюга. Дана ДНК-матриця може бути утворена за рахунок простого нагрівання подвійної спіралі ДНК до високої температури. ДНК-полімераза також потребує малої секції подвійної ДНК (праймер) для ініціації синтезу.

Рис. 6. Цикл ПЛР

Зразок ДНК відпалюють з метою розділення ланцюгів (первинна денатурація, потім реакційна суміш проходить послідовні цикли (кожен цикл включає реакції приєднання праймера, синтезу ДНК та денатурацію). Концентрація комплементарної послідовності подвоюється за кожним циклом.

Під дією температури подвійний ланцюг ДНК поділяється комплементарно на окремі ланцюги, що складають термінову матрицю для праймерів та ДНК-полімерази. Після цього температуру зменшують для того, щоб дати можливість олігонуклеотидним праймерам приєднатися комплементарно до послідовності ДНК. Ця температура називається температурою “випалу” ДНК та забезпечує можливість варіації визначення специфічності ПЛР (температура та термін реакції залежать від послідовності, яку треба ампліфікувати). Отримані ланцюги є первинні матриці для ДНК-полімерази.

На наступному кроці температуру знову підвищують до 72°C, оптимальної температури для *Taq*-ДНК-полімерази, яка буде детально розглянута в наступному підрозділі. Температура 72°C підтримується протягом 5 хв для забезпечення синтезу ДНК. Наприкінці цього періоду температура знову підвищується до 94°C, але тільки на 30 с. Це приводить до того, що коротка спіраль подвійної ДНК (оригінальний ланцюг та ланцюг, що новосинтезований комплементарно) роз’єднуються. Дані окремі ланцюги стають матрицею для наступного циклу синтезу ДНК, і цикл нагрівання з метою розподілення ланцюгів, приєднання праймерів та синтезу за дією ДНК-полімерази повторюються багато разів (від 30 до 60 циклів).

Технічне забезпечення зміни температури реакційної суміші стрімко розвивалося останнім часом. Спочатку ПЛР здійснювалася за допомогою трьох водяних бань, налаштованих на різну температуру: для денатурації ДНК, випалу праймерів і полімеризації. Пробірки переносилися з однієї водяної бані в іншу “по колу”, завдяки чому відбувалася зміна температури на різних етапах циклу. Існували й варіанти приладів, де у водяну баню, в якій знаходилися пробірки з реакційною сумішшю, по чергово подавалась вода різної температури. Зміна циклів у цих випадках займала багато часу, і процес погано піддавався автоматизації.

Зараз для здійснення ПЛР в основному використовуються прилади (термоциклери), які змінюють температуру автоматично на основі заданої програми. У термоциклерах пробірки з реакційною сумішшю вміщуються в металевий блок, температура якого змінюється за допомогою елемента Пельтьє. Елемент Пельтьє дозволяє змінювати температуру блока з великою швидкістю, що скорочує тривалість кожного циклу ПЛР.

Сучасні термоциклери пристосовані для використання спеціальних пластикових пробірок для реакційної суміші, що дозволяє прискорити теплообмін

між блоком приладу й реакційною сумішшю і в кінцевому результаті додатково скоротити час проведення реакції.

Таким чином, стандартна ПЛР може бути здійснена за 1–3 год. Багато приладів дозволяють програмувати спеціальні ускладнені температурні профілі, необхідні для специфічних модифікацій процесу ПЛР.

Паралельно з удосконаленням технології ПЛР розвивалися й методи аналізу продуктів реакції. Метод гель-електрофорезу з подальшим фарбуванням барвником, специфічним до ДНК, наприклад бромистим етидієм, традиційно застосовується в багатьох лабораторіях для виявлення ампліфікованої ДНК і визначення її розміру.

Протокол стандартної ПЛР

Протокол стандартної ПЛР містить умови для проведення ПЛР, які забезпечують можливість до ампліфікації багатьом послідовностям полінуклеотидів. Ця процедура може бути більш удосконалена для проведення ПЛР у конкретних випадках, особливо, коли це потребує збільшення відсотка достовірності повторення результатів діагностичного аналізу або іншої аналітичної процедури.

1. Унести 100 мкл реакційного розчину в 0,5 мл мікропробірку, добре змішати суміш та нанести 75 мкл мінеральної олії:

- частина ДНК (10^5 – 10^6 нуклеотидів). Наприклад, 1 мкг одичної копії ДНК геному людини дорівнює 3×10^5 нуклеотидів; 10 нг ДНК дріжджів дорівнює 3×10^5 нуклеотидів. 1% М13 вірусу чуми – 10^6 нуклеотидів; 1 нг ДНК *E.coli* – 3×10^5 нуклеотидів;
- 20 рМ кожного праймера ($T_m > 55^\circ\text{C}$);
- 20 мМ трис-НСІ (рН 8,3; 20°C);
- 1,5 мМ MgCl_2 ;
- 25 мМ КСІ;
- 0,05% твін 20;
- 100 мкг/мл желатину або альбуміну (вільних від нуклеаз);
- 50 мкМ кожної *d*НТФ;
- 2 одиниці *Taq*-ДНК-полімерази.

2. Проведення 25–35 циклів ПЛР, використовуючи такий режим температури:

- денатурація – 96°C , 30 с;
- приєднання праймера – 55°C , 30 с;
- добування праймера – 72°C , 1,5 хв.

3. Цикли продовжуються до останньої реакції, де добування праймера триває протягом 5 хв, 72°C . Реакція зупиняється зниженням температури до 4°C або додаванням до розчину ЕДТА (10 мМ).

Спочатку для полімеразної ланцюгової реакції використовували ДНК-полімеразу *E. coli*, але цей фермент термолабільний та дезактивується за температурою, необхідною для розділення подвійних ланцюгів ДНК. Тому необхідно додавати цей фермент на кожному циклі всього процесу (це запобігає

автоматизації процесу). Велике значення мало відкриття бактерій, що існують у гарячих струмках та мають ДНК-полімеразу, стабільну за високих температур. Бактерії *Thermus aquaticus* живуть у воді, яка має 75°C. Їх ДНК-полімераза (*Taq*-полімераза) має оптимум – 72°C та стабільна й при 94°C! *Taq*-полімераза може бути введена у розчин тільки один раз на початку реакції та залишатися активною до кінця всіх циклів ПЛР. Наявність цього ферменту дала можливість розробити автоматичний варіант ПЛР. Для цього необхідно тільки мати термоциклер – спеціальний прилад, який запрограмований на підтримання зазначеної температури протягом відповідного часу. Отже, зараз усі складники для ПЛР можна внести у пробірки, розташовані в термоциклері й усі цикли реакції будуть відбуватися автоматично.

Лабораторія МЕДИГЕН (Росія) сьогодні пропонує 6 термофільних ДНК-полімераз, за допомогою яких можна здійснити велику частину відомих маніпуляцій, пов'язаних з полімеразною ланцюговою реакцією. ***Taq*-ДНК-полімераза** – класичний фермент для проведення ПЛР у різних модифікаціях. ***Medi**Taq*-ДНК-полімераза** – фермент, спеціально призначений для ампліфікації дуже малих кількостей ДНК: 5-10 молекул ДНК-матриці цілком досить для певної ампліфікації в більшості випадків. Фермент ідеально підходить для ДНК-діагностики. ***Pfu*-ДНК-полімераза** – фермент має 3'-5' коригувальну активність. Кількість помилок в ампліконах, отриманих за допомогою *Pfu*-ДНК-полімерази, у 10 разів менша, ніж в аналогічних ампліконах, отриманих за допомогою звичайної ДНК-полімерази. Фермент рекомендується використовувати для одержання ампліконів з метою подальшого клонування, а також для одержання довгих ампліконів (30 п.о. і більше). ***Taq*-star-ДНК-полімераза** – модифікована форма ДНК-полімерази, неактивна без попереднього підігріву протягом 15 хв при 95°C, призначена для проведення ПЛР з "гарячим стартом". ***Tth*-ДНК-полімераза** – фермент має ДНК-полімеразну й ревертазну активності. **Термосеквеназа** – генно-інженерно модифікована форма *Taq*-ДНК-полімерази, що має значно більшу спорідненість із дидезоксинуклеозидтрифосфатами порівняно зі звичайною *Taq*-ДНК-полімеразою.

ТЕМА 12. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

У 1971 р., через 12 років після того як Ялоу і Берсон розробили кількісний радіоімунний метод аналізу, одночасно в декількох лабораторіях був запропонований інший метод кількісного аналізу – імуноферментний аналіз. Імуноферментний аналіз (ІФА), що має порівняльну чутливість з радіоімунним аналізом, був позбавлений деяких властивих йому недоліків, що й сприяло його поширенню. Очевидні переваги методу, до яких можна віднести відносну простоту виконання аналізу й інтерпретації отриманих результатів, доступність і стабільність реагентів, як правило, невисоку собівартість аналізу, можливість автоматизації проведення масових аналізів забезпечили його широке застосування як в клінічних, так і наукових лабораторіях. Закріпленню даного аналізу в лабораторній практиці сприяли успіхи біотехнології, завдяки яким стали більш

доступними реагентами, що застосовуються в ІФА (високоочищені антитіла й антигени, маркерні ферменти).

Увесь процес імуноферментного аналізу умовно можна розділити на декілька основних етапів:

- 1) формування специфічного комплексу “антиген-антитіло”;
- 2) уведення в утворений комплекс мітки;
- 3) візуалізація зв'язаної мітки.

Стосовно способу виконання всі варіанти ІФА можна розділити на дві групи: 1) системи, що не потребують розділення компонентів реакційної суміші (гомогенні методи); 2) системи, для яких розділення необхідне (гетерогенні методи). Під час проведення гомогенного ІФА ферментативну активність аналізованого розчину вимірюють без попереднього фізичного розділення мічених лігандів на вільні і пов'язані з антитілами. Це можливо у випадках, коли активність мічених лігандів, пов'язаних з антитілами, значно відрізняється від активності вільних мічених лігандів. Під час проведення гетерогенного ІФА отримують дві окремі фракції міченого ліганду: пов'язану з антитілами і вільну, і лише потім вимірюють активність цих фракцій. Фізичне розділення пов'язаної з антитілами і вільної фракцій у цьому випадку обов'язкове, оскільки надалі аналізується розподіл мічених кон'югантів між цими фракціями.

На сьогодні розроблено безліч різних варіантів як гомогенного, так і гетерогенного ІФА. Однак у клінічній практиці набули поширення порівняно небагато способів.

Як правило, твердофазний ІФА проводять у полімерних планшетах, які мають плоске прозоре дно, що зручно для вимірювання оптичної щільності розчину в лунках на спеціальних приладах – ІФА-рідерах, однак у якості твердої фази можуть використовуватися і спеціальні пробірки (наприклад, у закритих системах фірми “Роше Діагностик”), колонки, латексні кульки, нітроцелюлозні мембрани, певним чином підготовлені скляні пластини та інші матеріали. Планшети, що використовуються, можуть бути розбірними на окремі вертикальні елементи (стріпи) або ж монолітними. Планшети, які можна розібрати, більш зручні тим, що в разі необхідності можна використовувати лише ту кількість стріпів, яка необхідна для проведення аналізу, а не весь планшет цілком. Стандарними вважаються планшети, що містять 96 лунок, однак останнім часом деякі виробники пропонують планшети для ІФА з 384 (“Лабсистемс”), 864 (“Порваєр Фільтронікс Лтд”) і навіть іноді більшою кількістю лунок. Останні два типи розраховані на застосування в автоматичних аналізаторах – ІФА-процесорах, призначених для одночасного проведення великої кількості аналізів з мінімальним утручанням людини.

Основні принципи проведення твердофазного ІФА

Практично будь-яка модифікація твердофазного ІФА заснована на таких принципах:

1. Значна кількість різних антигенів (білки, полісахариди, ліпополісахариди) здатні зв'язуватися із полістероловим пластиком. Це

стосується й антитіл, що є білками. Важливо при цьому те, що вони зберігають здатність зв'язувати антигени. Саме ця властивість використовується на першому етапі ІФА, коли сенсibiliзують антигени або антитіла на поверхні твердої фази. В адсорбованому стані антитіла й антигени не змиваються з поверхні твердої фази буфером, що містить деяку невелику кількість детергенту, тоді як незв'язані реагенти легко відділяються таким розчином. У разі застосування комерційних наборів для ІФА фірми, які готують ці набори, беруть на себе даний етап аналізу і постачають набори з уже сенсibiliзованими на твердій фазі (наприклад, на поверхні лунок планшета) антигенами або антитілами.

2. Далі в сенсibiliзованих лунках планшета інкубують досліджувані зразки і стандартні (калібрувальні) реагенти. У цьому випадку на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси, що складаються з одного або декількох шарів (залежно від виду аналізу). Компоненти, що не зв'язалися, на кожному етапі видаляють промивкою буфером з детергентом.

3. На наступному етапі аналізу з іммобілізованими імунними комплексами реагує штучний кон'югант “антитіло–фермент” або “антиген–фермент”. Потрібно зазначити, що фермент і антитіло, що входять до складу кон'юганта, зберігають нативні властивості, тобто фермент здатний взаємодіяти з субстратом і каталізувати специфічну хімічну реакцію, а антитіло може взаємодіяти з антигеном. Подальша інкубація з розчином субстрату приводить до розвитку кольорової реакції. Хід реакції у разі досягнення необхідної інтенсивності забарвлення зупиняють додаванням реагенту, що зупиняє реакцію, а результат аналізу оцінюється за оптичною щільністю розчину субстрату (візуально або за допомогою ІФА-рідера). В окремих випадках (дот-аналіз) відбувається фарбування безпосередньо твердої фази, оскільки застосовуються хромогенні типи субстрату, що дають нерозчинні продукти.

Наведемо ферменти, субстрати, довжини хвиль, за яких вимірюють оптичну щільність розчинів із продуктами реакції, найбільш поширених в ІФА (табл. 3).

Таблиця 3

Ферменти та субстрати, що використовуються в ІФА

Фермент	Розчинний субстрат	Рекомендована довжина хвилі, нм	Нерозчинний субстрат
Пероксидаза хрому (ПХ)	Орто-фенілендіаміндігідрохлорид (ОФД)	492 450	Діамінобензидин (ДАБ)
	Тетраметилбензидин 2,2'-Азиноди-(3-етил) бензотіазолінсульфонова кислота (АБТС)	650 405	4-Хлор-1-нафтол (ХНФ)

	5-Аміносаліцилова кислота (АСК)	450	3-Аміно-4-етилкарбазол (АЕК)
Лужна фосфатаза (ЛФ)	N-n-нітрофенілфосфат лужний (ПНФФ)	402 – 412	Нафтол As-mx фосфат+діазоль синій 2С (НАФДС)
			Нафтол As-mx фосфат+діазоль червоний ТР (НАФДК)
			5-Бром-4-хлор-3-йодилфосфат (БХНФ)
β-Галактозидаза (β-Г)	Орто-нітрофеніл-β-D-галактозид (ОНФГ)	420	
Уреаза	Бромкрезоловий пурпурний (БП)	588	

За чутливістю (тобто за кількістю антитіл або антигенів, що мінімально виявляються) різні варіанти твердофазного ІФА можна розділити на три категорії:

1. Варіанти, засновані на конкуренції. У цих варіантах ІФА антигени або антитіла, що аналізуються, конкурують з гомологічними міченими молекулами за приєднання до комплементарного реагенту, зв'язаного з твердою фазою, кількість якого обмежена. Чутливість у даному варіанті аналізу визначається афінністю (константою асоціації) антитіл, що використовуються, і похибками під час проведення аналізу і, як правило, не перевищує 1 нг/л.

2. Варіанти, засновані на гальмуванні. У цьому випадку на першому етапі аналізу досліджувані антитіла або антигени приєднуються до міченого вільного реагенту (кон'юганта). Завдяки цьому на наступному етапі спостерігається гальмування зв'язування міченого реагенту з комплементарним іммобілізованим лігандом. Інтенсивність розвитку хромогенної реакції у даних варіантах аналізу (як і в попередніх) обернено пропорційна концентрації молекул, що досліджуються. Чутливість цих методів визначається такими ж чинниками, що і в першому варіанті.

3. Варіанти, засновані на прямій імунометрії. У цій групі методів використовується здатність іммобілізованого на твердій фазі реагенту (антитіла або антигени) вибірково зв'язуватися з комплементарними молекулами із зразка, що досліджується. Кількість молекул (а відповідно і концентрація цієї речовини в зразку), що зв'язалися, оцінюється за з'єднанням комплементарного міченого реагенту. Тим часом на поверхні твердої фази утворюється потрійний шар молекул, комплементарно зв'язаних. У цьому випадку інтенсивність сигналу,

індукованого міткою, прямо пропорційна кількості досліджуваного компонента, який приєднався до іммобілізованого реагенту. У подібних системах іммобілізований і мічений реагенти повинні бути наявні в надмірній кількості відносно речовини, що аналізується. Такі методи дуже чутливі, але й тут чутливість обмежується специфічною активністю ферменту, інтенсивністю сигналу й чутливістю реєструвальних пристроїв. Системи посилення сигналу з метою подальшого підвищення чутливості частіше застосовуються з подібними методами, ніж із засобами, заснованими на гальмуванні або конкуренції.

Імунохроматографічний аналіз

Ферментний імунохроматографічний аналіз поєднує в собі багато особливостей методу ферментних каналів й аналізу на основі імунокапілярної міграції.

Даний вид аналізу набув широкого застосування в останнє десятиріччя в клінічній біохімії. Його простота, надійність, висока швидкість виконання забезпечили йому високу популярність серед фахівців. Одна з очевидних переваг методу – те, що для його проведення практично не потрібно спеціальної апаратури (на відміну, наприклад, від ІФА). Саме тому даний аналіз став незамінний у польових умовах, коли потрібно терміново провести аналіз прямо на місці, або коли результат лікарю необхідно знати терміново, протягом декількох хвилин. Результат аналізу має, як правило, напівкількісний або якісний характер, однак для лікаря часто саме таку відповідь і необхідно знати (наприклад, наявність у пацієнта в крові інфекційних антигенів).

Імунохроматографічний аналіз проводиться на спеціальній мембрані у формі смужки. Її “робоча ділянка” занурюється на декілька секунд в рідину, що досліджується, або невелика кількість цієї рідини наноситься на певну ділянку мембрани. Під впливом капілярних сил рідина спрямовується по мембрані. На певній ділянці смужки рідина потрапляють в зону, де на мембрану нанесений кон'югант (наприклад, моноклональне антитіло–колоїдне золото). Частки кон'юганта розчиняються і рухаються з рідиною далі по смужці. У разі наявності дослідного антигену в рідині, що аналізується, утворюються розчинні комплекси “антиген–кон'югант”, які здатні рухатися разом з рідиною далі. У тестовій ділянці на вузькій частині мембрани на її поверхні ковалентно приєднані антитіла до антигену, що визначається (як правило – поліклональні). Потрапляючи в цю ділянку, комплекс “антиген–кон'югант” взаємодіє через вільні антигенні детермінанти з Fab-фрагментами іммобілізованих антитіл. У цьому випадку на певній частині мембрани утвориться ділянка, де внаслідок взаємодії кон'юганта з антитілами на мембрані з'являється чітко видима смуга, зумовлена наявністю колоїдного золота. У разі відсутності дослідного антигену в рідині, що аналізується, кольорова смуга в тестовій області не з'являється. У контрольній області індикаторної смужки завжди з'являється чітко видима смуга, що підтверджує правильність проведення аналізу. У більш розвинутих системах подібного типу може бути передбачений також внутрішній стандарт, що показує

інтенсивність кольорової реакції за певної концентрації в зразку речовини, що досліджується.

За допомогою таких діагностичних систем у наш час визначають:

1. Стрептококи А і В. Стрептококи групи В є поширений патогенний агент, що спричиняє інфекційні гнійні захворювання, небезпечні для життя плоду та новонародженого. Від 5 до 30% вагітних жінок є носії або страждають на запальні захворювання, що спричинені стрептококом групи В. Доведено, що своєчасне виявлення й лікування прихованої стрептококової інфекції у вагітних жінок значно знижує кількість випадків виникнення септичних ускладнень, як у жінок, так і новонароджених. Порівняно з культуральним методом діагностики, що дає результат через 24– 48 год, даний метод дозволяє зняти всі питання вже через 15– 20 хв.
 2. Ліпополісахаридні антигени *Chlamydia trachomatis*, збудника поширених інфекцій, що передаються, як правило, статевим шляхом.
 3. Антитіла проти вірусів гепатиту В, С у сироватці або плазмі крові. У цей час можна вважати встановленим зв'язок вірусного гепатиту С з розвитком гепатоцелюлярної карциноми, хронічного гепатиту, цирозу та інших захворювань печінки.
 4. Приховану кров (гемоглобін) у калі. Наявність гемоглобіну в калі людини може свідчити про деструктивні захворювання шлунка та кишечника (наприклад, виразкова хвороба), а також про багато онкологічних захворювань шлунково-кишкового тракту.
 5. Альфа-фетопротеїн у сироватці або плазмі крові людини.
 6. Простатоспецифічний антиген (ПСА) у сироватці або плазмі крові. Дані системи виявляють ПСА у сироватці крові за його концентрації більш 5 нг/мл (норма – 0,1–2,6 нг/мл), що може свідчити про рак простати.
 7. Антитіла до *Helicobacter pylori* в сироватці, плазмі або суцільній крові. Установлений зв'язок між виявленням *Helicobacter pylori* і активізацією хронічних гастритів, виникненням виразкової хвороби.
 8. Підвищений рівень *IgE* в сироватці крові людини (моніторинг алергічних станів).
 9. Антитіла проти ВІЛ-1/ВІЛ-2 (вірус імунодефіциту людини) у сироватці, плазмі й суцільній крові.
 10. Антитіла проти паличок Коха (збудників туберкульозу).
 11. Міоглобін у сироватці крові. Нормальний рівень міоглобіну в сироватці людини – 60 нг/мл. Підвищення його рівня до 1500 нг/мл спостерігається в пацієнтів після інфаркту міокарда.
 12. Наркотичні препарати в сечі.
- Визначається ще ряд інших речовин, причому щорічно їх кількість збільшується.

Імуногістохімічний аналіз

Стрімкий розвиток біологічних наук веде до вдосконалення діагностичних технологій і впровадження їх у практичну охорону здоров'я. Методи сучасної біохімії включають комплекс можливостей дослідження

клітинних і позаклітинних структур, патологія яких спричиняє багато захворювань. Цілеспрямоване впровадження найсучасніших методів і засобів лабораторних досліджень дозволить підвищити якість лабораторної діагностики і скоротити витрати на проведення обстеження пацієнтів, підвищити якість медичного обслуговування.

Для верифікації діагнозу (особливо в онкології) застосовуються:

1. Світлооптична мікроскопія (цитологічне і гістологічне дослідження після стандартних фарбувань).
2. Електронна мікроскопія.
3. Імунологічні дослідження (імуофлуоресценція, імуноцитохімія та імуногістохімія).
4. Цитогенетичні та молекулярні методи дослідження.

Імунохімічний аналіз широко застосовується в онкоморфології для визначення прогнозу, моніторингу онкологічних захворювань. Метод виконується на клітинних чи тканинних мікропрепаратах, залитих у парафін (чи на кріопрепаратах). Імуногістохімія (ІГХ) – це метод виявлення точної локалізації того чи іншого клітинного компонента (антигену) *in situ* за допомогою імунологічних і гістохімічних реакцій. Авторами цього методу по праву вважається група дослідників під керівництвом Альберта Кунса, які вперше одержали мічені флуоресцеїном антитіла і застосували їх у діагностичних цілях. Значного поширення ІГХ набула в 70-ті роки після визначення наявності імуноглобулінів у плазматичних клітинах. Наступні роки були відзначені не тільки удосконалюванням власне методу, але й розширенням сфер його застосування.

Основа ІГХ – також реакція антигену й антитіла. Як антиген може виступати практично будь-який клітинний або позаклітинний компонент: структурні білки клітин, поверхневі глікопротеїни лімфоцитів, рецептори гормонів, ростові фактори та їх рецептори, колаген IV типу, онкопротеїни, вірусні білки та ін. У наш час до цих антигенів накопичені як сироватки імунізованих тварин, що містять суміш антитіл, до декількох епітопів, вироблені багатьма клонами – такі антитіла називають поліклональними, так і моноклональні антитіла, як правило, мишачі. Моноклональні антитіла не містять домішок, що можуть зустрічатися в сироватці, і головне, вони високоспецифічні.

Послідовність проведення реакцій під час ІГХ дуже подібна до ІФА, різниця полягає лише в тому, що для ІГХ треба підготувати відповідний гістологічний препарат. Це включає фіксацію гістологічного препарату, заливання в парафін, приготування напівтонких зрізів, регідрацію зрізів.

Для ІГХ можна застосовувати також різні варіанти імунохімічного аналізу (непрямий, конкурентний та ін.), які описані вище.

Стандартність методики ІГХ досягається використанням спеціалізованого обладнання, наприклад Sequenza № 73300001. Апарат містить камери для інкубації, панель реагентів, буфери, таймер. Для дослідження мікропрепаратів використовується спеціальний протокол-інструкція, прикладений до апарата. Інший засіб для виконання імунохімічних реакцій – автоматичний апарат NexES (№750-200) – компактна настільна система “walk away”, що одночасно вміщує від

1 до 25 мікропрепаратів і забезпечує цикл протягом 60–90 хв з вибіркою із 17 перших антитіл. NexES – універсальна система для виконання методів імуногістохімії з високим рівнем контролю якості, дозволяє використовувати перші антитіла будь-яких фірм, одержувати стандартно відтворені результати. Оцінка результатів імунного фарбування здійснюється за допомогою комплексу АРМ № LMM12001. До складу комплексу входять: мікроскоп фірми NIKON E200 чи E400, цифрова камера, комп'ютер Pentium, програмне забезпечення, набір медичних атласів на CD-ROM, принтер.

ВИСНОВКИ

Не применшуючи значення тієї величезної кількості даних, накопичених до теперішнього часу, дуже важливо усвідомити наскільки поверхневі наші знання в багатьох сферах біології. Серед тих проблем, які ще треба буде вирішити, мабуть, найбільш важливі дві: з'ясування біохімічних основ індивідуального розвитку та диференціювання й функції мозку. Хоча хімічна природа генетичного матеріалу детально вивчена, про механізм включення й вимикання генів у процесі розвитку організму ми не знаємо майже нічого. З'ясування механізму регуляції генів необхідно для вивчення процесів диференціювання клітин і перетворення нормальних клітин у ракові. Зараз про розподіл і ріст клітин (нормальних і пухлин), про регуляцію цих процесів ми знаємо вкрай мало. Практично нічого не відомо про біохімічну основу складних процесів нервової діяльності, включаючи такі явища, як свідомість і пам'ять. Досить обмежені відомості про механізми клітинної секреції. Незважаючи на певний прогрес, невідома молекулярна природа багатьох поширених генетичних хвороб; втім, можна сподіватися, що в найближчі кілька років завдяки розвитку техніки рекомбінантних ДНК тут будуть досягнуті помітні успіхи. Уже визначена нуклеотидна послідовність усього генома людини, правда, залишаються сумніви, чи є цей підхід оптимальним з погляду використання людських ресурсів.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Fredericks, D.N. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases [Text] / D.N. Fredericks, D.A. Relman. – Clin. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 29. – P. 457–488.
- Антитела. Методы [Текст]: в 2 т. / под ред. Д. Кэти. – М.: Мир, 1991. – Т.1. – 285 с.
- Дикий, Н.А. Основы научных исследований [Текст] / Н.А.Дикий, А.А. Халатов. – К.: Вища шк., 1985. – 223 с.

- Єріна, А.М. Методологія наукових досліджень [Текст]: навч.посібник / А.М. Єріна. – К.: МОН, – 2004. – 216 с.
- Иммунологические методы [Текст] / под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
- Иммунологические методы исследований [Текст] / под ред. И. Лефковитса, Б. Пернса. – М.: Мир, 1988. – 527 с.
- Ковальчук, В.В. Основы научных исследований [Текст]: навч.посібник/ В.В. Ковальчук. – К.: Вища шк., 2004. – 208 с.
- Кучеренко, М.Є. Сучасні методи біохімічних досліджень [Текст] / М.Є. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, В.М. Войціцький. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 421 с.
- Лакин, Р.Ф. Биометрия [Текст] / Р.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 320 с.
- Лапач, С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 68 с.
- Лудченко, А.А. Основы научных исследований [Текст] / А.А. Лудченко, Я.А. Лудченко, Т.А. Примак. – К., 1999. – 78 с.
- Основы научных исследований [Текст]: учеб. для техн. вузов / В.И. Крутов, под ред. В.И. Крутова, И.М. Грушко, В.В. Попова. – М.: Высш. шк., 1989. – 399 с.
- Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных задач STATISTICA [Текст] / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 92 с.
- Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований [Текст] / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – СПб.: ВМедА., 2002. – 242 с.

ЗМІСТ

Вступ	3
Тема 1. Методологічні основи наукового пізнання	4
Тема 2. Організація та проведення наукового дослідження	14
Тема 3. Статистична обробка результатів наукових досліджень	23
Тема 4. Оформлення результатів наукових досліджень	28
Тема 5. Буферні розчини	36
Тема 6. Субклітинне фракціонування	40
Тема 7. Електрофорез	43
Тема 8. Хроматографічні методи	44
Тема 9. Етапи дослідження первинної структури білків і пептидів	48
Тема 10. Загальний експериментальний підхід, застосований у біохімії	51
Тема 11. Полімеразна ланцюгова реакція	55
Тема 12. Імуноферментний аналіз	59
Висновки	65

Темплан 2010, поз. 54

Навчальне видання
Галина Олександрівна Ушакова
Артем Олександрович Тихомиров
Віктор Станиславович Недзвецький

**Методи наукових досліджень
у фізіології, біохімії та мікробіології**

Навчальний посібник

Редактор А.А. Гриженко
Техредактор Л.П. Замятіна
Коректор А.А. Гриженко

Підписано до друку 28.01.10 Формат 60x84/16. Папір друкарський.
Друк плоский. Ум. друк.арк. 4,0 . Ум. фарбовідб. 4,0. Обл.-вид. арк. 4,7
Тираж 200 пр. Зам. № 73.

РВВ ДНУ, просп. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010.
Друкарня ДНЕУ, вул. Наукова, 5, м. Дніпропетровськ, 49050