

ЛЕКЦІЯ № 1

Тема: Основи наукового дослідження. Експеримент, як головний прийом дослідження

План.

1. Мета і завдання дисципліни.
2. Методологічні основи наукових досліджень
3. Прийоми організації наукової праці
4. Підготовка до дослідження
- 4.1 Збір та отримання інформації. Джерела інформації та методи роботи з ними
- 4.2 Вивчення літератури
5. Методи дослідження в біології
6. Експеримент

1. Мета і завдання дисципліни.

Мета викладання навчальної дисципліни: дати уяву про сучасний рівень і методи проведення наукових досліджень в біології, законодавчі правила і етичні принципи використання лабораторних тварин, основи розведення та догляду за лабораторними тваринами, принципи відбору лабораторних тварин у дослідження, правила виконання маніпуляцій.

Основними завданнями є ознайомлення з особливостями наукової роботи та її організації, значенням сучасних досліджень у галузі біохімії, імунології, фізіології, генетики людини і тварин, а також мікробіології та вірусології для науково-технічного прогресу; ознайомлення зі специфікою біологічного експерименту; усвідомлення значення правильного підбору піддослідних тварин для вирішення тих чи інших проблем біології та медицини; вивчення правил роботи, утримання і догляду за лабораторними тваринами; виховання гуманного відношення до тварин; ознайомлення з основами лабораторної техніки та з вимогами до постановки експерименту.

Приступаючи до вивчення невідомого біологічного об'єкта або явища, дослідник прагне отримати найбільш повну та достовірну інформацію. Для цього йому доводиться використовувати різні методи і способи отримання інформації про об'єкт. Ефективність отримання цієї інформації залежить від знання експериментатором методів досліджень і вміння їх застосувати відповідно до поставленим завданням.

Наука - це сфера людської діяльності, спрямована на вироблення і систематизацію нових знань про природу, суспільство і т.д.

Предметом науки є світ, різні форми і види руху матерії, їх свій відбиток у свідомості людини.

Всі галузі знань поділяються на:

- громадські науки;
- Природні і точні науки;
- Технічні і прикладні науки, галузі економіки;
- Загальногалузеві і комплексні проблеми (міжгалузеві проблеми).

Цілі науки:

1. Збір, аналіз, і узагальнення фактів (сукупність даних).

2. Виявлення законів руху природи, суспільства, мислення, свідомості і т.д. (Збір знань по галузях).

3. Систематизація наукових знань (збір рішень по галузях).

4. Пояснення суті явищ і процесів (чому явища відбуваються саме так).

5. Прогнозування явищ і процесів (побудова моделей).

6. Встановлення напрямків і форм практичного використання отриманих знань (як застосувати отримані знання).

У кожній науці різниться **емпіричний** рівень, тобто накопичений фактичний матеріал - підсумки спостережень і експериментів, і рівень **теоретичний**, тобто узагальнення емпіричного матеріалу, виражене у відповідних теоріях, законах і принципах; засновані на фактах наукові припущення, гіпотези, що потребують подальшої перевірки досвідом.

Сучасний поділ науки як системи:

Теорія → метод, методологія і техніка дослідження → практичне впровадження

Методологія - найзагальніші уявлення про те, як робити.

Метод - конкретний набір інструкцій, створений на основі методології.

Техніка наукових досліджень - сукупність спеціальних прийомів для використання того чи іншого методу.

Класифікація наук:

1. Науки про природу - природничі науки.

2. Науки про суспільство - гуманітарні та соціальні.

3. Науки про мислення і пізнання - логіка, гносеологія і т. Д.

2. Методологічні основи наукових досліджень.

Методологія науки - це наукова дисципліна, яка вивчає методи науково-пізнавальної діяльності. Методологія науки здійснює дослідження, пошук, розробку і систематизацію методів, які застосовуються в цій діяльності для отримання наукового знання і тих загальних принципів, якими вона спрямовується.

Наукові дослідження - це діяльність, спрямована на всебічне вивчення об'єкта, процесу, а також отримання і впровадження у практику корисних для людини результатів.

Види наукових досліджень:

За цільовим призначенням наукові дослідження діляться на:

1. Фундаментальне дослідження - експеримент або теоретична діяльність, спрямована на отримання нових знань про основні закономірності будови, функціонування, розвитку.

2. Прикладні наукові дослідження - дослідження, спрямовані переважно на застосування нових знань для досягнення практичних цілей і вирішення конкретних завдань.

3. Пошукові дослідження - дослідження, спрямовані на визначення шляхів вирішення наукових завдань.

4. Розробка - дослідження, які спрямовані на впровадження в практику конкретних фундаментальних і прикладних досліджень.

За тривалістю наукові дослідження діляться на:

1. Довгострокові (кілька років).
2. Короткострокові (кілька місяців).
3. Експрес - дослідження (не більше 1.5 - 2 місяці).

За джерелом фінансування наукові дослідження діляться на:

1. Бюджетні (замовник - держава; фінансується з бюджету).
2. Госпдоговірні (конкретну особу, фізична або юридична, на свої гроші замовляє дослідження).
3. Ініціативні (дослідник на свої власні кошти проводить дослідження).

Хід наукових досліджень:

1. Постановка проблеми.
2. Гіпотеза (передбачуване рішення проблеми).
3. Теорія (модель).
4. Експеримент (або вирішує проблему, або ні) - при необхідності - повернення на гіпотезу або теорію.

Особливості наукової праці:

1. Творчий характер.
2. Наукова праця не піддається прямому регулюванню.
3. Наступність (існують наукові школи, що працюють над вирішенням конкретної наукової проблеми довгий час).
4. Робота в колективі.
5. Динамічність роботи, мобільність кадрів і організаційних форм (людина вивчає весь час не одне і те ж).

Особисті властивості науковців:

1. Організованість (дотримання режиму в роботі).
2. Дотримання системи досліджень (послідовне виконання системи).
3. Дисципліна наукової праці (певне чергування праці і відпочинку).
4. Самостійність.

3. Прийоми організації наукової праці.

Всі наукові дослідження проводяться за планом.

Типовий план наукових досліджень.

(Підходить для всіх наукових досліджень).

1. Вивчення літератури за темою досліджень (складання літературного огляду) - необхідно для того, щоб той, хто запитує роботу (не фахівець) увійшов в курс справи і для того, щоб якщо вчений, який проводить літературний огляд.

2. Закупівля матеріалів та реактивів.

3. Оренда обладнання (найчастіше обладнання легше не купувати, а орендувати.

У серйозної наукової організації оформляється документи запиту і рахунок):

3.1. Для виготовлення зразків.

3.2. Для проведення досліджень.

4. Наймання персоналу.

5. Приготування зразків.

6. Проведення дослідження.

7. Обробка результатів (+ відбір).

8. Складання звіту - оформлення, подання звіту разом з результатами наукових досліджень.

План наукових досліджень дуже важливий; в ньому повинні бути враховані всі дрібниці, тому що по ньому проводиться виплата коштів на дослідження (гроші видаються підприємству, а не самим ученим). Якщо щось спочатку не враховано, то дуже складно отримати у замовника додаткові кошти.

Правила ведення індивідуальної робочої документації.

У кожного вченого є індивідуальний план і робочий журнал (щоденник).

Індивідуальний план - журнал з 4 графами (може бути і більше):

1. Дата отримання завдання.
2. Формула завдання.
3. Термін, до якого треба надати результат.
4. Форма звіту (таблиці, залежності, креслення, стаття, макет зразка).

Робочий журнал (щоденник) - в нього заносять всі дані і результати дослідження, виписки з літератури, свої ідеї, думки. Робочий журнал необхідний для подальшого складання звіту.

Робочий журнал відрізняється від щоденника тим, що в останньому все фіксується лаконічніше (хід роботи і етапи виконання).

4. Підготовка до дослідження.

4.1 Збір і отримання інформації. Джерела інформації і методи роботи з ними.

Джерело інформації - це документ, що містить будь-які відомості, призначені для поширення інформації, яка в ньому міститься; пройшов редакційно-видавниче опрацювання; поліграфічно самостійно оформлений, має вихідні відомості.

Вихідні відомості - це назва, автори, що видає організація, рік видання, анотація, випускні дані (скільки паперу, друкованих аркушів, шрифт, гарнітура) тощо.

До джерел інформації відносяться:

- а) первинні (статті, результати досліджень, безпосередньо описують проведення дослідження)
- б) вторинні (обробка (огляд якихось статей))

Видання класифікуються за:

1. Цільовим призначенням (офіційні, наукові, довідкові).
2. Ступенем аналітико-систематичної переробки інформації (інформаційна, оглядова, бібліографічна, реферативна).
3. Матеріальними конструкціями (книга, журнал, листівка, газета).
4. Знаковою природою інформації (текст, ноти, карти та ін.).
5. Обсягом (листівка (1-4 стор.), брошура (5-40 стр.), книга (понад 40 аркушів)).
6. Періодичністю (неперіодичне, серіальне, періодичне, триваюче).
7. Складом основного тексту (монограми і збірники).
8. Структурою (серія, 1 том, багатотомник, зібрання творів тощо).

Для навчально-наукової діяльності потрібні наукові, навчальні, довідкові, інформаційні видання.

Наукові видання:

1. Монографія (то, що написано однією людиною або колективом від початку і до кінця).

2. Автореферат дисертації.

3. Препринт (попереднє видання - наукове видання, що містить матеріали наукового характеру і опубліковується до видання, в якому вони з'являться).

4. Збірник наукових праць (збірник, який містить наукові матеріали будь-якої установи).

5. Матеріали наукової конференції.

6. Тези доповіді конференції (короткий виклад матеріалу доповіді конференції).

7. Науково-популярне видання (містить відомості про дослідження в будь-якій області, які спеціально викладені у формі, зрозумілої неспеціалісту).

Науковим вважається видання, що містить результати теоретичних і / або експериментальних досліджень.

Навчальне видання - видання, що містить систематизовані відомості наукового або прикладного характеру, викладені у формі, зручною для викладання і навчання і розрахована на учнів різного віку і ступеня навчання. Види навчальних видань: підручник, навчальний посібник та навчально-методичний посібник.

Підручник - навчальне видання, що містить систематичний виклад навчальної дисципліни або її частини, що відповідає навчальній програмі та офіційно затверджене.

Навчальний посібник - видання, яке доповнює або частково замінює підручник, офіційно затверджене як таке видання.

Навчально-методичний посібник - видання, що містить матеріали з методики викладання.

Довідково-інформаційні видання:

1. Довідкове видання - видання, що містить короткі відомості наукового або прикладного характеру, розташовані в порядку, зручному для швидкого відшукування і не призначене для суцільного читання (словники, довідники і т.д.).

2. Інформаційне видання - видання, що містить систематизовані відомості про документи або результат аналізу і узагальнення відомостей, представлених в першоджерелі.

3. Бібліографічний видання - містить впорядковану сукупність бібліографічних записів.

4.2 Вивчення літератури.

Вивчення літератури починається з підбору і складання списку

Існує 3 види каталогів:

а) *алфавітний* (за назвою, автору)

б) *систематичний* (по окремих галузях знань в порядку, визначеному бібліографічною класифікацією)

в) *предметний* (назви розміщені по певним предметам, темам досліджень)

Вивчення доцільно починати з реферативних видань, збірників наукових праць з даної теми.

Після визначення і взяття потрібної літератури необхідно ознайомитися з книгами в загальних рисах.

В обов'язковому порядку записуються вихідні відомості книги (потім в своїй роботі робляться посилання на книги і статті, використані раніше).

Існує два способи роботи з книгою:

1. Швидкий перегляд.
2. Ретельне опрацювання тексту.

Дуже корисно після роботи з книгою скласти картку реферату / анотацію роботи за цією статтею. Також короткі реферати використовуються для написання власного огляду: вони зручніше самої книги.

5. Методи дослідження в біології

Метод дослідження: це спосіб отримання цільової інформації, заснований на якісному або кількісному зв'язку властивості біосистеми з вимірюваним параметром, що характеризує цю властивість

Класифікація методів дослідження

Загально-наукові методи	Конкретно-наукові	
	Теоретичні	Емпіричні
1. Загальнотеоретичні: - абстракція і конкретизація; аналіз і синтез; порівняння; індукція і дедукція; моделювання; 2. Соціологічні: 3. Соціально-психологічні: 4. Математичні: - Метод зведення і групування; - Метод абсолютних, відносних і середніх величин; - Метод показників варіації; - Метод кореляційно-регресійного аналізу; - Метод вибіркового спостереження; - Метод масового спостереження; - Метод аналізу рядів динаміки; - індексний метод; - Метод приведення паралельних даних; - Метод побудови кореляційних таблиць; - Графічний метод	- аналіз літератури; - аналіз сучасних документів; - аналіз результатів діяльності; - побудова гіпотез; - метод аналогій; - побудова уявного експерименту; - прогнозування.	- спостереження; - бесіда; - дискусія; - Дослідна робота; - Створення діагностичних ситуацій; - самооцінка, взаємооцінка, експертна оцінка. - специфічні методи (н-д, методи біоіндикації); - Вивчення продуктів діяльності.

Розглянемо **конкретно-наукові** методи дослідження

Теоретичні:

1. Аналіз літератури, документів і продуктів діяльності людини: є одним з методів отримання первинної інформації на ранніх стадіях дослідження для попереднього знайомства з об'єктом.

Літературні джерела служать підставою для аналізу історії і сучасного стану проблеми, дають можливість розглядати мало розроблені і дискусійні положення, різні точки зору, створювати первинне уявлення про проблему та шляхи її вирішення.

Аналіз продуктів діяльності: допоміжний метод дослідження, що дозволяє судити про психічні процеси, рівні розвитку особистості, здібності по продуктам праці - наприклад, малюнків, творів тощо.

Вивчення продуктів діяльності дозволяє судити про досягнутий рівень діяльності і про сам процес виконання поставлених завдань, про сумлінність і завзятості в досягненні мети, про ступінь ініціативи і творчості, про зрушення в розвитку особистості.

2. Побудова гіпотез

Слово «гіпотеза» (від лат. Hypothesis) - підстава, припущення, судження про закономірний зв'язок явищ. Гіпотеза - це можливе знання, яке не доведене логічно і не підтверджене досвідом

Вимога до гіпотези: узгодженість з фактичним матеріалом.

3. Понятійно-термінологічна система

Поняття - це думка, що відображає в узагальненій формі предмети або явища дійсності, а також зв'язок між ними.

Поняття утворюється шляхом операцій узагальнення і абстрагування.

Визначити поняття - означає вказати, що воно означає, виявити ознаки, що входять до його змісту.

Завдання визначення:

- Відрізнити і обмежити предмет від всіх інших.
- Розкрити сутність предмета.

Вимоги до визначення:

- Повинно бути відповідним.
- Не повинно містити «порочного кола».
- Повинно бути ясным і чітким.
- Вільно від двозначності.
- Недопустима підміна метафорами і порівняннями.

4. Уявний експеримент

В ході уявних експериментів дослідник подумки уявляє собі кожен крок своєї уявної дії з об'єктом і ясніше може побачити результати цих дій.

Емпіричні:

Бесіда як метод дослідження відрізняється цілеспрямованими спробами дослідника проникнути у внутрішній світ співрозмовника, виявити причини тих чи інших його вчинків.

Діалог - метод дослідження, що передбачає поперемінний обмін думками (включаючи міміку і жести) з приводу єдиного предмета обговорення з метою розвитку уявлень за темою.

В основі діалогу лежить *проблема*: в діалозі зіставляються, доповнюються, уточнюються різні точки зору, аспекти розгляду даної проблеми.

Дискусія - метод дослідження, що передбачає цілеспрямований і впорядкований обмін думками, спрямований на узгодження протилежних точок зору і прихід до загальної основи.

В основі дискусії лежить *протиріччя*, яке відображає протилежні погляди учасників на один і той же предмет обговорення.

Спостереження - найбільш поширений і доступний метод вивчення.

Під науковим спостереженням розуміється спеціально організоване сприйняття досліджуваного об'єкта, процесу або явища в природних умовах.

Для підвищення ефективності спостереження воно повинно бути тривалим, систематичним, різнобічним, об'єктивним і масовим.

Біоіндикація - метод, який дозволяє судити про стан навколишнього середовища за фактом зустрічі, відсутності, особливостям розвитку організмів-біоіндикаторів. Біоіндикатори - організми, присутність, кількість або особливості розвитку яких служать показниками природних процесів, умов або антропогенних змін довкілля.

Експеримент проводиться для того, щоб перевірити виниклу гіпотезу.

Надійність експериментальних висновків прямо залежить від дотримання умов експерименту. Всі фактори, крім перевірки, повинні бути ретельно вирівняні.

Біологія умовно поділяється на дві великі групи наук:

- ✓ **біологія організмів** - науки про рослини (ботаніка), тварин (зоологія), гриби (мікологія), мікроорганізми (мікробіологія)
- ✓ **загальна біологія** - молекулярний рівень (молекулярна біологія, біохімія та молекулярна генетика), клітинний (цитологія), тканинний (гістологія), органи та їх системи (фізіологія, морфологія та анатомія), популяції і природні співтовариства (екологія).

Біологія тісно пов'язана з іншими природничими науками:

На стику між біологією і хімією з'явилися **біохімія** та молекулярна біологія, між біологією і фізикою - **біофізика**, між біологією і астрономією - **космічна біологія**.

Екологія, що знаходиться на стику біології та географії, на даний час часто розглядається як самостійна наука.

Загальні методи досліджень в біології:

- Спостереження
- Описовий метод
- Історичний метод
- **Експериментальний метод**
- Моделювання
- Математичний метод
- Теоретичний (системний метод)

Між усіма перерахованого методами неможна проводити сувору межу.

Застосування в поєднанні один з одним, дає можливість більш повно й ефективного

досліджувати живі системи, а також встановлювати закономірності їх виникнення, розвитку та функціонування.

6. Експеримент

Експеримент - метод дослідження системи управління в певних умовах її функціонування, які можуть бути реальними або штучно створеними дослідником, для отримання необхідної інформації. Проведення експерименту зазвичай обумовлено необхідністю підтвердження або спростування наукової теорії або гіпотези. Підсумками експерименту можуть бути як якісні, так і кількісні характеристики досліджуваного об'єкта. Всі результати експерименту потребують теоретичної інтерпретації.



Перед кожним експериментом складається його план (програма), який включає:

- Мета і завдання експерименту
- Вибір варійованих факторів
- Обґрунтування обсягу експерименту, числа дослідів
- Порядок реалізації дослідів
- Визначення послідовності зміни чинників
- Вибір кроку зміни чинників, завдання інтервалу між майбутніми експериментальними точками
- Обґрунтування засобів вимірювань
- Опис проведення експерименту
- Обґрунтування способів обробки і аналізу результатів експерименту

Процес проведення експерименту складається з наступних складових:

- розробка програми і плану експерименту;
- підготовка проведення експерименту;
- проектування моделей, установок, заходів з безпеки і зниження ризиків, систем фіксації, збору, накопичення та обробки інформаційних даних;
- виконання експериментальних робіт;
- аналіз результатів експерименту;
- узагальнення, оцінка та розробка рекомендацій з використання експерименту.

Основні форми представлення результатів:

✓ кваліфікаційна робота ; науково-дослідницька робота.

Кваліфікаційна робота - курсова, дипломна робота, дисертація - служить для того, щоб студент, аспірант або здобувач, представивши своє наукове дослідження, отримав документ, що засвідчує рівень компетентності. Вимоги до таких робіт, способу їх оформлення та подання результатів викладені у відповідних інструкціях і положеннях, прийнятих вченими радами.

Результати науково-дослідної роботи - це результати, отримані в ході дослідницької діяльності вченого.

Подання наукових результатів зазвичай відбувається в трьох формах:

1) усний виклад; 2) публікація; 3) електронна версія.

Розрізняють такі варіанти представлення інформації:

вербальна форма (текст, мова), **символічна** (знаки, формули), **графічна** (схеми, графіки), **предметнотворча** (макети, речові моделі, фільми тощо).

ЛЕКЦІЯ № 2

Тема: Основи техніки лабораторних робіт

План:

1. Принципи організаційної діяльності в лабораторії
2. Лабораторне обладнання і допоміжні приладдя
3. Хімічні реактиви і способи їх очистки
4. Мікроскоп і техніка мікроскопіювання

1. Принципи організаційної діяльності в лабораторії

«Лабораторія» походить від латинського слова **laborare**, що означає працювати, обробляти.

Значення клініко-діагностичної лабораторії в діагностиці і лікуванні різних захворювань: від якості проведених досліджень (біохімічних, коагулологічних, гематологічних, гормональних, імунохімічних, загальноклінічних, гістологічних та ін.) багато в чому залежить правильності постановки діагнозу і оцінка ефективності призначеного лікування

Для аналізу біоматеріалів у сучасній лабораторії використовується різноманітне обладнання. Залежно від профілю лабораторії і переліку, виконуваних в ній досліджень, можуть бути виділені робочі місця для різних аналітичних робіт: фотометрії, мікроскопіювання тощо.

Робочі місця для ручної роботи обладнуються на лабораторних столах, які можуть бути призначені для роботи сидячи або стоячи. Столи можуть бути обладнані настільними стелажми, мати тумби з полицями або висувними ящиками



Острівний стіл на 2 робочих місця



Пристінний стіл на 1 робоче місце

Для кожної методики (або групи близьких методик) має бути підготовлено своє робоче місце, на якому зібрані потрібні реактиви та посуд



- ✓ піпетки і дозатори встановлюють в пробірках, які стоять в штативах або на спеціальних підставках;
- ✓ кожна пробірка підписується для якого реактиву або операції призначається;
- ✓ на флаконах з реактивами приклеюються етикетки з назвами реактивів і датами приготування.

Все необхідне для роботи слід розміщувати таким чином, щоб будь-який потрібний предмет - пробірку, піпетку, дозатор, флакон із реактивом - було зручно дістати рукою, не встаючи з місця.

Після закінчення аналізу посуд і реактиви можуть бути прибрані, щоб звільнити робочу поверхню столу для інших робіт.

Освітлення:

Гарне освітлення підвищує гостроту зору, сприяє підвищенню якості роботи, а недостатнє освітлення - призводить до перенапруження зору і швидкої втоми. Робоче місце може висвітлюватися природним світлом (в цьому випадку слід розташовувати столи перпендикулярно до вікон) або загальними світильниками, розташованими на стелі. У разі необхідності робоче місце може висвітлюватися локальним світильником.

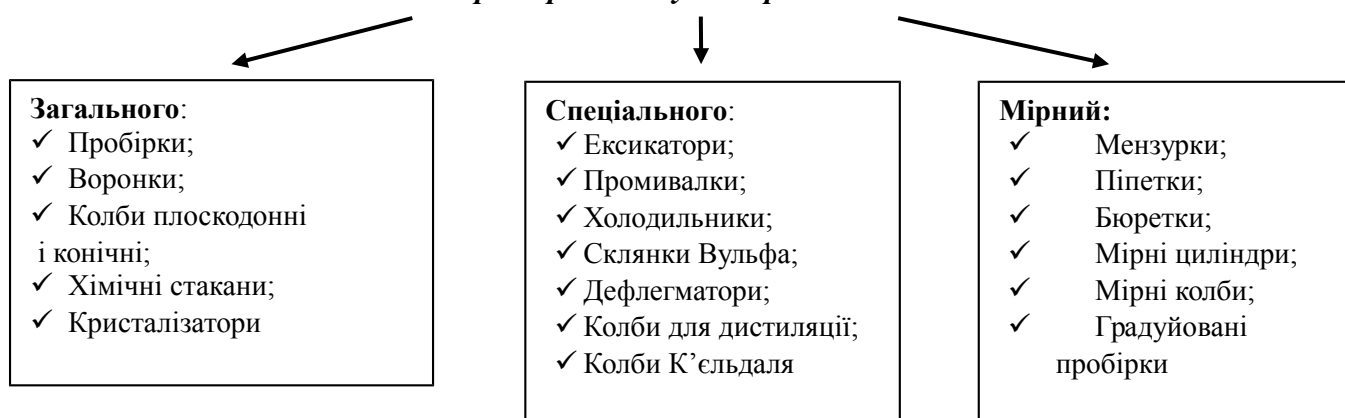
Потрібно мати на увазі підвищену чутливість до дії світла деяких речовин і вживати заходів до захисту проб біоматеріалу від надлишкового освітлення.

2. Лабораторне обладнання і допоміжні приладдя

Проведення будь-якого експерименту, лабораторно-клінічного дослідження неможливе без використання хімічного лабораторного посуду: мірного, порцелянового, загального і спеціального призначення.

Чистота хімічного посуду при аналітичних дослідженнях має велике значення; **при використанні недостатньо добре вимитого хімічного посуду (через недбалість або через невміння) можуть бути отримані спотворені результати досвіду і зроблені неправильні висновки.**

Лабораторний посуд за призначенням



Матеріали, з яких виготовляється лабораторний посуд:

- ✓ Скло;
- ✓ Порцелян;
- ✓ Метал;
- ✓ Пластмаса (контейнери для проб біоматеріалу, пробірки, наконечники для піпеток). Перевага пластмаси перед склом - вона не б'ється, легше, дешевше

Лабораторний посуд:

- ✓ **Одноразового використання** (здебільшого з пластмаси, не потребує миття).



Вакуумні пробірки для прискореного взяття крові: vacutainer із замком. Вони закриті гумовими ковпачками, повітря в них розріджене, що дозволяє використовувати спеціальні двосторонні голки, увівши один кінець голки в вену, іншим її кінцем пройшовши через гумову мембрану. При цьому розряджена атмосфера всередині пробірки спонукає кров з вени швидко виливатися в пробірку, що значно скорочує час стискання вени джгутом і обмежує негативний вплив цього стискання на утримання деяких показників і, тим самим, на результати лабораторного дослідження. Випускаються також пробірки з консервантами, антикоагулянтами.

- ✓ **Багаторазового використання** (з полімерних матеріалів - поліетилену, поліпропілену та ін.):
Пробірки полімерні (без етикетки, з етикеткою, з кришкою):



Поліпропіленові колби Ерленмейера з гвинтовою кришкою (для титрування, для зберігання і вирощування клітинних культур)

Поліпропіленові мірні колби з гнучкою пробкою

Циліндри поліпропіленові — висока прозорість, не нагрівати вище 80 С.
Циліндри з полі-метилпентена - кришталева прозорість, не нагрівати вище 121 С

Кварцовий посуд

- ✓ має надзвичайно високу стійкість до цілого ряду хімічних речовин, підходить для кислотних і нейтральних розчинів;
- ✓ витримує різкі переходи від тепла до холоду і тому є особливо цінним при науково-дослідних роботах;
- ✓ хімічний посуд з прозорого кварцу витримує більш високі температури, ніж звичайне скло (до 1200°C);
- ✓ висока фізична міцність;
- ✓ пропускає як видимі світлові промені, так і ультрафіолетові, що буває необхідно для органічних синтезів і аналітичних робіт.



З прозорого кварцового скла виготовляють колби, пробірки, чаші, склянки, тиглі, воронки, наконечники тощо.

Порцеляновий посуд

Переваги перед скляним: міцніший (стійка до механічного впливу); не боїться сильного нагрівання (до 1400 градусів) і перепадів температури; в ньому можна наливати гарячі рідини, не побоюючись за цілісність посуду; стійкий до механічного впливу. Недоліки виробів: важкі, непрозорі і значно дорожче скляних; концентровані розчини кислот і лугів їх руйнують



Види порцелянового посуду:

- ✓ Шпателі;
- ✓ Кружки;
- ✓ Ложки;
- ✓ Ступка;
- ✓ Тиглі;
- ✓ Випарювальні чашки

Фторопластовий посуд

Використовують для різного роду хіміко-аналітичних робіт, оскільки він відрізняється високою хімічною стійкістю до:





- всіх мінеральних і органічних кислот,
- лугів,



- органічних розчинників,
- окислювачів та інших агресивних середовищ.

Досить широкий температурний інтервал експлуатації (від -269°C до $+250^{\circ}\text{C}$)

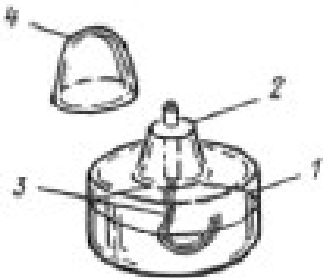



Лабораторний посуд спеціального призначення

Найменування посуду	Опис
<p>Колба Вюрца</p> 	Застосовується при перегонці рідин. Колба має зазвичай довге горло і кругле дно. Від горла убік відходить відросток, який потрібен для виходу парів рідини при її перегонці. Горло колби закривають пробкою.
<p>Ділильна воронка</p> 	Застосовується для розділення двох або декількох рідин одна в одній і які мають різну щільність. Суміш рідин наливають у воронку, тут вона розшаровується, потім через нижній край випускають кожну рідину по черзі у судини, що підставляються.
<p>Чашка Петрі</p> 	Складається з двох циліндричних плоскодонних судин з низькими стінками. Судини ці підібрані за діаметром так, щоб одну з них можна було накрити іншою. Використовується для посіву мікробів на різні середовища.
<p>Промивалка</p> 	Використовується для промивання та змивання залишків зі стінок судин.
<p>Ексикатор</p>	Говстостінна скляна посудину з пришліфованою кришкою, на дно якої поміщають вологопоглинаючу речовину (конц. сірчана кислота, хлорид кальцію); використовується для висушування або зберігання висушених матеріалів.

	
<p>Холодильник</p> 	<p>Застосовується при перегонці рідин і складається з двох частин - внутрішньої трубки з розширенням на одному кінці, за допомогою якого холодильник надягається на прилад, і зовнішньої сорочки з двома отворами, в яку надходить для охолодження водопровідна вода.</p>



Лабораторні нагрівальні прилади

Найменування	Опис
<i>Нагрівальні прилади на рідкому паливі</i>	
<p>Спиртівка</p> 	<p>Невеликий скляний балон, який заповнюється денатурованим спиртом. В горло балончика вставляють гніт, укріплений в рухомому металевому тримачі. 1 – резервуар; 2 – трубка з диском; 3 – фітиль; 4 – ковпачок</p>
<i>Електронагрівальні прилади</i>	
<p>Електричні лабораторні плитки</p> 	<p>Бувають з відкритою і закритою спіраллю. На плитці з відкритою спіраллю не можна нагрівати легкозаймисті речовини. На плитках з закритою спіраллю можна нагрівати будь-які рідини і при розливі яких не відбувається замикання струму. Їх спіраль закрита керамікою або сталевую кришкою. Вони дають більш рівномірне нагрівання. Температурний режим роботи до 350-400°C. Плитки використовують в лабораторіях для нагрівання скляного лабораторного посуду (колби, склянки).</p>

<p>Сушильна шафа</p> 	<p>Використовують для висушування лабораторного посуду та визначення вологості твердих матеріалів. Шафа має камеру з дірчастими полками, через які відбувається вільна циркуляція повітря. Стінки шафи металеві, подвійні, зовні облицьовані азбестом. Між стінками, а також в дно шафи вмонтована електроспираль. Температура (від + 30 ° С до + 300 ° С) регулюється автоматично, а контролюється за термометром. У клінічних лабораторіях, частіше користуються сушильно-стерилізаційними шафами. Це універсальний прилад, який використовують для сушки і одночасної стерилізації лабораторного посуду та інструментів. Стерилізацію проводять для посуду, що стикається з кров'ю, слизовою або рановою поверхнею</p>
<p>Водяна баня</p> 	<p>Пристрій для нагрівання пробірок і колб, коли необхідна температура становить до 100°C. Має металевий корпус, нагрівальний елемент, систему із знімних кілець, що дозволяють розміщувати в бані різні колби об'ємом до 1 л, склянки, чашки, тощо, блок управління, оснащений індикаторами режимів, електронним регулятором температури, а також системою захисту від перегріву. При використанні рекомендується заповнювати її дистильованою водою з додаванням карбонату натрію 0.1 г / л. Рівень рідини повинен бути на 60-70 мм нижче основи верхньої кришки. В період роботи бані необхідно стежити за рівнем рідини у ній і своєчасно її доливати, не допускаючи повного випаровування.</p>
<p>Піщана баня</p> 	<p>Призначена для більш сильного нагрівання і являє собою електричну плитку з бортом, спіраллю, закритою керамікою, на яку насипають чистий і прокалений пісок. Ця монолітна конструкція складається з лотка і нагрівальної поверхні. Використовується для рівномірного і повільного нагріву до 100 – 4000</p>
<p>Масляна баня</p>	<p>Влаштована так само, як і водяна, тільки заповнюється мінеральним маслом (мах t 180-270 С). Роботу з масляною банею проводять під тягою, не можна допускати попадання води в масло. При загорянні масла необхідно загасити його додаванням порції холодного масла, або користуючись азбестовим листом, насуваючи його збоку.</p>
<p>Термостат</p> 	<p>Призначений для підтримки всередині робочої камери високостабільної температури, необхідної для проведення бактеріологічних та серологічних досліджень в клініко-діагностичних та санітарно-бактеріологічних лабораторіях. У термостатах вирощують на поживних середовищах бактерії, проводять біохімічні реакції найчастіше при температурі 37°C. Термостат має робочу камеру, в якій знаходиться нагрівальний елемент, з подвійними стінками (стінки можуть бути пластмасові або металеві). У товщі зовнішньої стінки прокладають шар теплоізолюючого матеріалу (азбест, войлок, пробка). Термостат</p>

	має терморегулятор із зовнішнім важелем і термометр
--	---

Допоміжне приладдя

Найменування	Опис
<p>Лабораторний штатив Бунзена</p> 	<p>Для тривалого нагрівання і утримування лабораторного посуду. Це залізний стрижень, угвинчений у важку чавунну підставу. На стрижні зміцнюються різні деталі за допомогою затиску. Затиск має дві муфти, розташовані у взаємно перпендикулярних площинах і забезпечені гвинтами. Одну з муфт, ширшу, закріплюють на осі штатива так, щоб її отвір було направлено до працюючого. Друга муфта залишається вільною. Її отвір завжди повинний бути спрямованим вгору. У цю муфту вкладають і закріплюють за допомогою гвинта лапки і кільця різних розмірів і систем. Лапки завжди повинні мати всередині пробкові або гумові прокладки, які оберігають скляний посуд при його стисканні і від зіткнення з холодною залізною лапкою. На кільце можна покласти азбестову сітку для нагрівання плоскодонної скляної колби, яка не витримує нагрівання на відкритому вогні або фарфорову чашку, яка провалюється крізь кільце. На кільці закріплюють воронку, через яку фільтрують.</p>
<p>Тигельні щипці</p> 	<p>Для загарбання гарячих тиглів, чашок, які не можна брати руками. Тигельними щипцями широко користуються при прожаренні на відкритому полум'ї невеликих шматочків деяких речовин.</p>

3. Хімічні реактиви і способи їх очистки

Проведення аналізу в лабораторії неможливо без використання хімічних речовин – **реактивів**. Вони бувають тверді і рідкі.

Хімічні реактиви випускаються і зберігаються в скляних або пластмасових банках із кришками, що щільно

закриваються. Кожна банка повинна мати етикетку з назвою речовини, його хімічною формулою та інформацією про дату випуска, строк зберігання та про клас чистоти реактиву. На етикетці вказується також вміст основної сполуки і основних домішок.

Залежно від змісту основної та допустимих домішок хімічні реактиви мають наступні марки чистоти:

а) за ступенем чистоти

Класифікація хімічних реактивів за ступенем чистоти

Марки реактивів	Умовні позначення	Загальний вміст домішок	Область застосування
чистий	ч.	Не більше 2 %	Лабораторні роботи

			учбового та виробничого характеру
чистий для аналізу	ч.д.а	0,5-1%	Науково-дослідні і аналітичні роботи
хімічно чистий	х.ч.	Не перевищує 10^{-3} - 10^{-5} %	Відповідальні науково-дослідні роботи
високочисті - Спектрально-чисті - Еталонної чистоти - Особливо чисті	с.п. е.ч. о.ч.	$10^{-3} \cdot 10^{-5}$ % $10^{-5} - 10^{-10}$ % $10^{-5} - 10^{-10}$ %	Спеціальні роботи
технічний	техн.	Більше 2%	

Три перші марки охоплюють всі реактиви загального призначення.

Препарати більш високої чистоти застосовуються лише для спеціальних робіт, де інколи навіть мільйонні долі відсотка домішок є неприпустимими. Ними користуються у промисловості напівпровідникових матеріалів, радіоелектроніці, квантовій електроніці.

При проведенні більшості дослідів і синтезів використовують реактиви «ч.» і «ч.д.а.».

Для технічних цілей, наприклад, приготування охолоджуючих сумішів або миття посуду, рекомендується брати найбільш дешеві реагенти

б) за властивостями

а) гігроскопічні (вологочутливі)

Поглинання вологи може відбуватися при негерметичній упаковці реактиву і може привести не тільки до зволоження речовини, але і зміни його властивостей.

б) світлочутливі

Деякі речовини під дією світла змінюються, вступаючи в реакції окислення, відновлення, ізомеризації тощо.



в) пожежонебезпечні

До них відносяться такі сполуки, які здатні від короткочасного контакту з джерелом запалювання (іскра, полум'я, нитка розжарення) або мимовільно запалюватися.

г) отруйні

Багато хімічних реактивів у більшій чи меншій мірі отруйні. Особливо небезпечно систематичне попадання в організм людини протягом тривалого часу сполук, що викликають хронічні отруєння (сполуки ртуті, миш'яку, синильної кислоти, ментол тощо.). Навіть з'єднання, які використовуються щодня у великих кількостях, можуть бути токсичними. Працювати з такими речовинами потрібно тільки у витяжній шафі

Приклади реактивів, що відносяться до різних груп

Групи реактивів	Приклади реактивів	Умовні позначення
гігроскопічні	гідроксиди калію і натрію, хлорид амонію, ангідриди кислот і ін	
світлочутливі	розчин йоду, пероксиду водню, сполуки срібла.	
пожежонебезпечні	легкозаймисті рідини (ЛЗР) (спирт, ацетон, бензол, ефіри і ін.)	
отруйні	сполуки ртуті, миш'яку, синильної кислоти, ментол та ін.	

Умови зберігання

1. У лабораторному приміщенні повинні зберігатися **невеликі запаси** хімічних реактивів. Їх тримають в банках, склянках з пришліфованою скляними пробками або пластмасовими кришками з поліетилену, а

найбільш летючі (хлороводнева кислота, розчин аміаку, бром) - на спеціальних полицях у витяжній шафі.

2. Загальний запас ЛЗР, що одночасно зберігаються, не повинен перевищувати добові потреби. Склянки, в яких міститься більше 50 мл ЛЗР, повинні зберігатися в залізних ящиках для пального з щільно закритою кришкою, зі стінками і дном, викладеними азбестом.

Світлочутливі реактиви зберігають у темних склянках або банках, обгорнутих чорним папером.

Сильні отрути повинні зберігатися в опечатаних шафах і сейфах.

Правила користування реактивами

1. Головна вимога до реактивів - їх чистота.

2. Не можна зсипати і зливати реактив з посуду, в якій проводиться реакція, назад в посуд для зберігання.

3. Не можна плутати пробки від посуду з різними реактивами, а також зберігати реактиви без пробок. Гумовими пробками не можна закривати склянки з бензином, керосином, бензолом, толуолом тощо, а також дихлоретаном, ефіром, від парів яких гума набухає і розм'якшується.

4. Не можна брати реактив руками

5. Банки з летючими речовинами повинні відкриватися в момент безпосереднього користування ними.

6. Роботи з отруйними, займистими речовинами і тими, що неприємно пахнуть, проводять у витяжній шафі.

7. При необхідності визначення запаху обережно направляти пари речовини рукою від посудини до себе.

8. Отруйні та їдкі реактиви після проведення роботи зливати в спеціальні склянки

Методи очищення хімічних реактивів

Якщо в лабораторії відсутній хімічний реактив певною мірою чистоти, його доводиться додатково очищати.

Найпоширенішими методами очищення є:

- ✓ фільтрування,
- ✓ центрифугування,
- ✓ перекристалізація,
- ✓ перегонка (дистиляція),
- ✓ сублімація,
- ✓ абсолютування (висушування).

Перекристалізація застосовується для очищення різних розчинних **солей** і багатьох **твердих органічних речовин**. В основі очищення речовин цим методом лежать дві основні властивості:

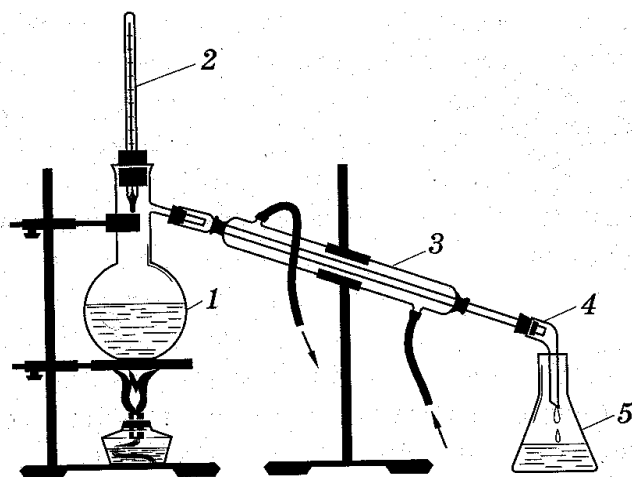
1) зміна розчинності речовин в залежності від температури;

2) властивість кристалів не включати (практично) у свою решітку сторонні речовини.

При перекристалізації готується гарячий насичений розчин. При охолодженні розчину внаслідок зниження розчинності виділяються кристали речовини, що очищується. Домішки залишаються в розчині.

Очищення перекристалізацією зводиться до розчинення забрудненої речовини при підвищеній температурі і подальшого виділення кристалів речовини з пересиченого розчину при більш низькій температурі. Це очищення можливо, якщо розчинність залежить від температури. Деяка кількість домішок може бути захоплена осадом, тому повторні перекристалізації підвищують чистоту отримуваної речовини.

Перегонка або дистиляція. При перегонці рідину шляхом нагрівання переводять в пароподібний стан, потім знову конденсують, тобто перетворюють у рідину. При цьому всі тверді домішки і більш висококиплячі рідкі домішки залишаються в колбі, а більш низькокиплячі домішки відганяються раніше основної рідини. Перегонкою очищають воду та інші рідини.



У колбу Вюрца (1) вставляють лійку з довгою трубкою і акуратно наливають рідину, що підлягає перегонці, кидають кілька капілярів з одним запаяним кінцем, це необхідно для рівномірного кипіння. Закривають горло колби пробкою з термометром (2). Після цього підставляють приймач для дистиляту (5) і починають нагрівати

Велике значення в лабораторії надають **перегонці** води, тому як всі розчини готують тільки на дистильованій воді.



Для отримання дистильованої води в лабораторіях застосовують аквадистилатори. Дистильована вода утворюється в дистилляторі за рахунок процесу перегонки, який заснований на тому, що при випаровуванні вода відділяється від усіх домішок, які в ній містилися. Вода, потрапляючи в перегінний куб дистиллятора, нагрівається в ньому до кипіння і починає випаровуватися. Конденсат, що утворюється в результаті випаровування не містить домішок. Це вже очищена вода. Така вода називається дистильованою (дистилят).

Очищення методом **сублімації** (возгонка). Деякі тверді речовини, наприклад йод, мають здатність при нагріванні не плавлячи переходити в твердий стан. Сублімація застосовується для очищення речовин від нелетких домішок. Цим методом можна очистити йод, хлорид амонію, сірку, тощо.

Зневоднення органічних реактивів.

При роботі в лабораторії часто доводиться очищати різні розчинники (спирт, ефір, бензол, тощо). Всі ці реактиви містять воду в тій або іншій кількості, присутність якої може заважати роботі. Тому ці реактиви, перш ніж переганяти, висушують. Очищені таким чином рідини називаються **абсолютними**. Оскільки органічні реактиви мають різні властивості, способи їх висушування різні. Так, проводять абсолютизування спирту, бензолу, ефіру.

4. Мікроскоп і техніка мікроскопіювання

Мікроскопічні методи дослідження - способи вивчення різних об'єктів за допомогою мікроскопа.

У біології та медицині ці методи дозволяють вивчати будову мікроскопічних об'єктів, розміри яких лежать за межами роздільної здатності ока людини.

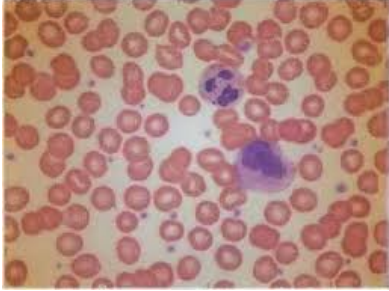
Основу мікроскопічних методів дослідження становить **світлова та електронна мікроскопія**.

У практичній і науковій діяльності вірусологи, мікробіологи, цитологи, морфологи, гематологи і ін. крім звичайної світлової мікроскопії використовують фазово-контрастну, інтерференційну, люмінесцентну, поляризаційну, стереоскопічну, ультрафіолетову, інфрачервону мікроскопію. В основі цих методів лежать різні властивості світла.

Сучасні лабораторні методи мікроскопії

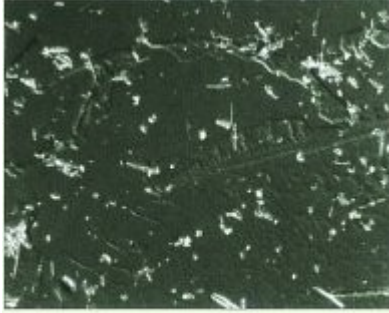
Метод світлого поля і його різновиди

Метод світлого поля в прохідному світлі



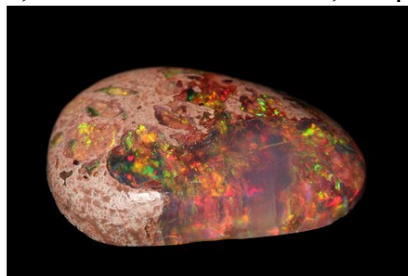
Застосовується при вивченні прозорих препаратів з включеними в них абсорбуючими (поглинаючими світло) частками і деталями, тому на світлому фоні видно більш темне зображення об'єкта. Це можуть бути, наприклад, тонкі забарвлені зрізи тваринних і рослинних тканин.

Метод косого освітлення - різновид попереднього методу.



Відмінність між ними полягає в тому, що світло на об'єкт направляють під великим кутом до напрямку спостереження. Іноді це допомагає виявити «рельєфність» об'єкту за рахунок утворення тіней. Застосовують для розгляду об'єктів з нерівним за товщиною контуром на сірому тлі.

Метод світлого поля у відображеному світлі застосовується при дослідженні непрозорих об'єктів, що відбивають світло, наприклад, шліфів металів або руд



Метод темного поля і його різновиди

Метод темного поля в прохідному світлі використовується для отримання зображень прозорих неабсорбуючих об'єктів, які не можуть бути видимі, якщо застосувати метод світлого поля. Темнопольна мікроскопія заснована на здатності мікроорганізмів сильно розсіювати світло. Для темнопольної мікроскопії користуються звичайними об'єктивами і спеціальними **темнопольними конденсорами**.

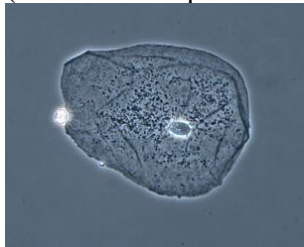
Основна особливість темнопольних конденсоров полягає в тому, що центральна частина у них затемнена, і прямі промені від освітлювача в об'єктив мікроскопа не потрапляють. Об'єкт висвітлюється косими бічними променями, і в об'єктив мікроскопа потрапляють тільки промені, розсіяні частинками, що знаходяться в препараті. Темнопольна мікроскопія заснована на ефекті Тиндаля, відомим прикладом якого служить виявлення порошинок у повітрі при висвітленні їх вузьким променем сонячного світла.

При темнопольній мікроскопії мікроорганізми яскраво світяться на чорному тлі. При цьому способі мікроскопії можуть бути виявлені дрібні мікроорганізми, розміри яких лежать за межами роздільної здатності мікроскопа. Однак темнопольна мікроскопія дозволяє побачити тільки контури об'єкта, але не дає можливості вивчити внутрішню структуру.



Метод фазового контрасту

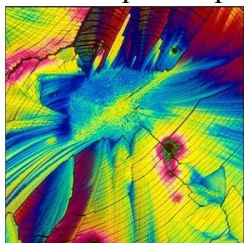
Призначений для отримання зображень прозорих і безбарвних об'єктів, невидимих при спостереженні за методом світлого поля. До таких належать, наприклад, живі незабарвлені тканини тварин). За результатами контраст живих нефарбованих мікроорганізмів різко збільшується, і вони виглядають темними на світлому фоні (позитивний фазовий контраст) або світлими на темному фоні (негативний фазовий контраст).



Ця мікроскопія особливо популярна в біології, оскільки не вимагає попереднього фарбування клітини, через яке та може загинути. У цих випадках часто застосовують біологічні мікроскопи із зворотним розташуванням оптики, коли об'єктиви розташовані знизу, а конденсор – зверху.

Поляризаційна мікроскопія

Це метод спостереження в поляризованому світлі для мікроскопічного дослідження препаратів, що включають оптично анізотропні елементи (або цілком складаються з таких елементів). Такими є деякі тварини і рослинні тканини та ін

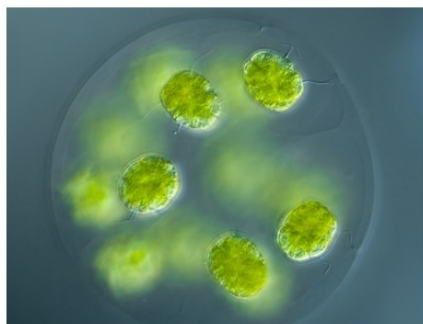


Така мікроскопія забезпечує кольорове, чітке і контрастне зображення на сірому або темному фоні.

Спостереження можна проводити як у прохідному, так і у відбитому світлі. Світло, що випромінюється освітлювачем, пропускають через поляризатор. Повідомлена йому при цьому поляризація змінюється при подальшому проходженні світла через препарат (або віддзеркаленні від нього). Ці зміни вивчаються за допомогою аналізатора і різних оптичних компенсаторів.

Метод інтерференційного контрасту

Полягає в тому, що кожен промінь роздвоюється, входячи в мікроскоп. Один з отриманих променів прямує крізь спостережувану частку, інший – повз неї по тій же або додатковій оптичній гілці мікроскопа. В окулярній частині мікроскопу обидва променя знову з'єднуються й інтерферують між собою.

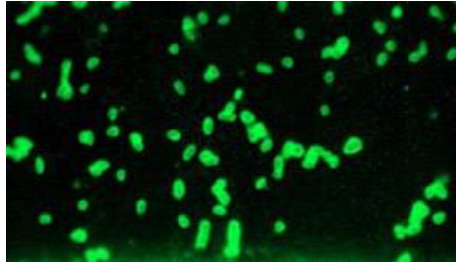


Один з променів, проходячи через об'єкт, запізнюється по фазі (набуває різниці ходу в порівнянні з другим променем). Величина цього запізнювання вимірюється компенсатором. Можна сказати, що метод інтерференційного контрасту схожий з методом фазового контрасту - вони обидва засновані на інтерференції променів, що пройшли через мікрочастинку і минули її. Як і фазово-контрастна мікроскопія, цей метод дає можливість спостерігати прозорі і безбарвні об'єкти, але їх зображення можуть бути і різнокольоровими (інтерференційні кольори). Обидва методи придатні для вивчення живих тканин і клітин.

Люмінесцентна мікроскопія, або флуоресцентна мікроскопія

Ця мікроскопія заснована на здатності деяких речовин люмінесциувати, тобто світитися при висвітленні невидимим ультрафіолетовим або синім світлом.

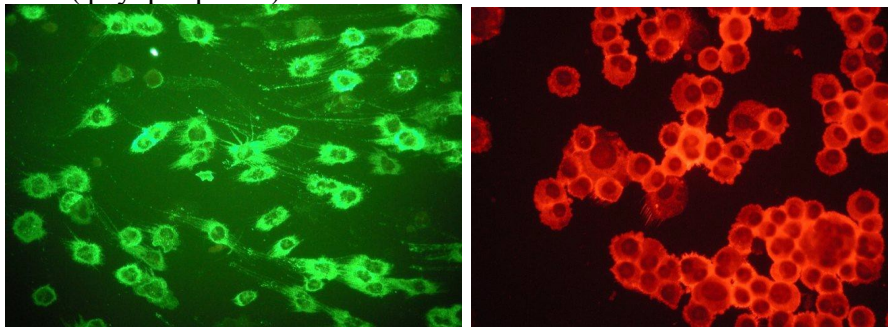
При збудженні люмінесценції синім світлом, колір її може бути від зеленого до червоного, якщо люмінесценція збуджується ультрафіолетовим випромінюванням, то світіння може бути в будь-якій частині видимого спектру. Ця особливість люмінесценції дозволяє, використовуючи спеціальні світлофільтри, які поглинають збудливе світло, спостерігати порівняно слабе люмінесцентне свічення.



Препарат рикетсій у люмінесцентному мікроскопі

Пристрій флуоресцентного мікроскопа і правила роботи з ним відрізняються від звичайного світлового мікроскопа в основному наступним: в оптичну схему мікроскопа вводяться два світлофільтри. **Один** з них поміщають перед конденсором. Він пропускає від джерела-освітлювача випромінювання лише ті довжини хвиль, які збуджують люмінесценцію або самого об'єкта (власна люмінесценція), або спеціальних барвників, уведених у препарат і поглинутих його частинками (вторинна люмінесценція). **Другий** світлофільтр, який встановлений після об'єктива, пропускає до ока спостерігача тільки світло люмінесценції. Люмінесцентний мікроскоп встановлюють у затемненій частині кімнати на міцному столі. Слід виключити вібрацію, повинна бути хороша вентиляція

Оскільки більшість мікроорганізмів і клітини крові не мають власної люмінесценції, існує кілька способів їх обробки для спостереження в флуоресцентному мікроскопі. Перш за все, це флуорохромування - фарбування сильно розведеними (до декількох мікрограмів / мл) розчинами флуоресціюючих барвників (флуорохромів).



Лабораторні мікроскопи



Лабораторні мікроскопи призначені для спостереження та морфологічних досліджень препаратів в світлі за методом світлого поля, а також за методом темного поля з конденсором. На мікроскопі можна вивчати забарвлені і нефарбовані біологічні об'єкти у вигляді мазків і зрізів.

Мікроскоп монокулярний

Мікроскоп бінокулярний

Люмінесцентні мікроскопи

Мікроскоп тринокулярний люмінесцентний призначений для досліджень мало контрастних клітинних культур тканин, осадів рідин і т.п., які перебувають у спеціальному посуді. Дослідження об'єктів проводяться в світлі за методом світлого поля і фазового контрасту, а також в світлі видимої люмінесценції.

Поляризаційні мікроскопи

Призначені для візуального спостереження і дослідження непрозорих об'єктів у відбитому поляризованому і звичайному світлі, а також прозорих об'єктів у світлі при малих збільшеннях. Пряма будова мікроскопу дозволяє досліджувати тільки тонкі плоскі об'єкти.

Цифрові мікроскопи

Широко застосовуються в біології, хімії, медицині. Цифровий мікроскоп передає зображення на вбудований ЖК-дисплей. Через USB з'єднання зображення можна передавати на екран комп'ютера або ноутбука - це робить процес дослідження зручним і наочним навіть для групи спостерігачів (цифрове збільшення до 500 крат).

ЛЕКЦІЯ № 3

СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

План:

1. Основні методи мікроскопічного аналізу
2. Методи дослідження біологічних об'єктів на тканиновому рівні
3. Принципи і методи гістохімічного фарбування. Основи імуноцитохімічного аналізу

1. Основні методи мікроскопічного аналізу

Діаметр типової клітини тварин становить 10-20 мкм. Тільки з появою удосконалених світлових мікроскопів на початку XIX століття вдалося встановити той факт, що всі тканини тварин і рослин складаються з окремих клітин. Це відкриття, узагальнене в формі клітинної теорії Шлейденом і Шванном в 1838 році, знаменує собою початок клітинної біології.

Будучи надзвичайно малими за розмірами, тваринні клітини до того ж безбарвні і прозорі; отже, відкриття їх основних структур стало можливим завдяки розробці набору барвників в кінці XIX століття. Саме барвники забезпечили достатній контраст для спостереження субклітинних структур.

Схожа ситуація спостерігалася на початку 40-х років XX століття, коли винахід потужного електронного мікроскопа зажадало нових методів збереження і забарвлення клітин. І тільки після того, як вони були розроблені, почала проявлятися вся складність клітинної структури.

В основі мікроскопії як методології досі лежать способи приготування зразка і можливості самого мікроскопа.

Мікроскоп (від лат. *Micros* - малий і *scopēin* - розглядати, спостерігати) - прилад, що дозволяє отримувати збільшене зображення об'єктів і структур, недоступних для людського ока.

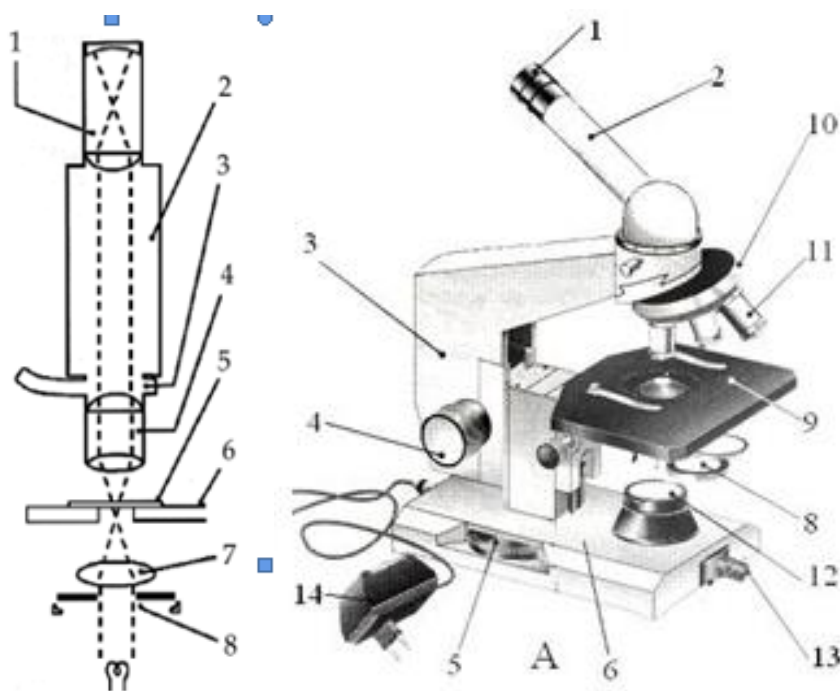
Мікроскопічні методи дослідження - способи вивчення різних об'єктів за допомогою мікроскопа.

У практиці медико-біологічних досліджень застосовуються методи **світлової** та **електронної** мікроскопії.

Світлові мікроскопи збільшують об'єкт більш ніж у **1500** разів, а **електронні** мікроскопи - більш ніж у **20 000** разів.

Світлова мікроскопія ґрунтується на законах геометричної оптики і хвильової теорії утворення зображення.

Загальна блок-схема світлового мікроскопа:



1 — окуляр, 2 — тубус, 3 — тубусотримувач, 4 — гвинт грубого наведення, 5 — мікрометричний гвинт, 6 — підставка, 8 — конденсор, ірисова діафрагма і світлофільтр, 9 — предметний столик, 10 — револьверний пристрій, 11 — об'єктив, 12 — корпус колекторної лінзи, 13 — патрон з лампою, 14 — джерело електроживлення.



Групи мікроскопів:

- Біологічні (із прохідним світлом);
- Інвертовані (із прохідним світлом);
- Люмінесцентні;
- Поляризаційні (із прохідним світлом);
- Аналізатори зображення;
- Стереоскопічні.

Групи мікроскопів за ступенем складності:

- Навчальні;
- Рутинні;
- Робочі;
- Лабораторні;
- Дослідницькі

Біологічний мікроскоп призначений для спостереження в світлі в світлому полі забарвлених і нефарбованих мазків крові, препаратів кісткового мозку, опадів сечі, клітинних концентратів, тканинних біотипів, гістологічних зрізів в спеціальних камерах і ін. При застосуванні фазово-контрастних пристроїв, конденсорів темного поля і косоого освітлення можливе спостереження мало-контрастних препаратів.

При гематологічному дослідженні мікроскоп дозволяє виробляти:

- Оглядовий перегляд препаратів крові і кісткового мозку,
- Диференціювання клітин крові за формою, структурою ядра і цитоплазми,
- Виявлення нормальних і патологічних еритроцитів,
- Виявлення малодиференційованих і атипичних клітин,
- Підрахунок формених елементів крові,
- Визначення лейкоцитарної формули та ін.

Найбільш поширеними в медико-біологічній практиці є мікроскопи прохідного світла плоского поля.

За допомогою мікроскопів прохідного світла плоского поля можна розглядати прозорі і напівпрозорі об'єкти

Товщина об'єкта для мікроскопів плоского поля має важливе значення, тому що це пов'язано зі здатністю біологічного об'єкта (препарату) до поглинання, відображення та пропускання світла. Безглуздо розглядати в мікроскопі прохідного світла об'єкт, який через свою товщину поглинає 80-90% світла або стільки ж відображає. Крім того, товщина об'єкта повинна бути такою, щоб оптичні елементи мікроскопа (і в першу чергу об'єктив) забезпечили розпізнавання об'єкта і розрішення складових його структур, а також найбільш точне відтворення геометричних параметрів об'єкта в площині в межах поля бачення, а по глибині - в межах глибини різкості об'єктива.

Основні характеристики мікроскопів прохідного світла плоского поля

Характерні ознаки	Обмеження у застосуванні
об'єкт спостереження є спеціально приготований препарат у відповідності із прийнятими методами мікроскопіювання	товщина об'єкта спостереження обмежена
об'єктиви розташовані над препаратом	робоча відстань об'єктива малих збільшень (до 10х) - до 10 мм, середніх збільшень (до 40х) - до 2 мм, великих (до 100х) - до 0,07 мм
джерело світла розташовано під препаратом	великі числові апертури об'єктивів обмежують глибину різкого огляду
максимальна товщина препарату 0,5 мм (або разом із покривним склом)	
об'єктиви розраховані на роботу із покривним та/або без покривного скла товщиною 0,17 мм (максимально 0,5 мм при роботі із камерою Горяєва)	

Біологічні об'єкти (препарати) у мікроскопах прохідного світла плоского поля:

Мікроскопи плоского поля інвертованого типу в основному застосовуються для вивчення культури клітин і тканин *in vitro*. Основна область застосування - біотехнологія, бактеріологія і ін.

Мікроскопи, в яких використовуються різні пристрої, що впливають на зміну фізичних властивостей об'єкта і світла, що пройшло і / або відбилася від об'єкта, складають групу спеціальних мікроскопів.

До них відносяться: люмінесцентні та поляризаційні мікроскопи.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНА (ЛЮМІНЕСЦЕНТНА) МІКРОСКОПІЯ.

Явища флюоресценції полягають у тому, що атоми і молекули ряду речовин (прості білки, коферменти, деякі вітаміни і лікарські засоби), поглинаючи короткохвильові промені, переходять у збуджений стан. Зворотний перехід із збудженого стану в нормальний відбувається з випусканням світла, але з іншою, більшою довжиною хвилі.

У флюоресцентній мікроскопії в якості джерел світла для збудження флюоресценції застосовують ртутні або ксенонові лампи надвисокого тиску, що володіють високою яскравістю в області спектра 0,25-0,4 мкм (ближні ультрафіолетові промені) і 0,4-0,5 мкм (синьо-фіолетові промені). Довжина світлової хвилі викликаной флюоресценції завжди більше довжини хвилі збуджувального світла, тому їх поділяють за допомогою світлофільтрів і вивчають зображення об'єкта тільки в світлі флюоресценції.

Розрізняють власну, або первинну, і наведену, або вторинну, флюоресценцію. Будь-яка клітина живого організму має власну флюоресценцію, проте вона часто буває надзвичайно слабкою. Вторинна флюоресценція виникає при обробці препаратів спеціальними барвниками - флюорохромами.

Флюорохроми можуть розподілятися в клітині дифузно або вібірково забарвлювати окремі клітинні структури або певні хімічні сполуки біологічного об'єкта.

Наприклад, при обробці препаратів найчастіше вживається флюорохром акридиновий помаранчевий. В цьому випадку ДНК і її сполуки в клітинах мають яскраво-зелене, а РНК і її похідні - яскраво-червоне свічення. Таким чином, спектральний склад випромінювання несе інформацію про внутрішню будову об'єкта, його хімічний склад. Варіант методу флюоресцентної мікроскопії, при якому і збудження, і випромінювання флюоресценції відбуваються в ультрафіолетовій області спектра, отримав назву методу ультрафіолетової флюоресцентної мікроскопії.

Принцип:

Світло певної хвилі, потрапляючи на об'єкт, змушує частину об'єкта, здатну до люмінесценції, світитися (можна препарат спеціально фарбувати люмінесцируючими барвниками - флюорохромами). Люмінесценція зрушена в довгохвильову частину спектру.

Ефект:

На темному (чорному) тлі спостерігається яскраво світиться зображення об'єкта

За допомогою імунофлюоресценції в люмінесцентному мікроскопі виявляють вірусні антигени і їх концентрацію в клітинах, ідентифікують віруси, визначають антигени і антитіла, гормони, різні продукти метаболізму і т.д ..

У зв'язку з цим люмінесцентну мікроскопію застосовують в лабораторній діагностиці таких інфекцій, як герпес, епідемічний паротит, вірусний гепатит, грип та ін., Використовують в експрес-діагностиці респіраторних вірусних інфекцій, досліджуючи відбитки зі слизової оболонки носа хворих, і при диференціальній діагностики різних інфекцій . У патоморфології за допомогою люмінесцентної мікроскопії розпізнають злоякісні пухлини в гістологічних та цитологічних препаратах, визначають ділянки ішемії м'язи серця при ранніх термінах інфаркту міокарда, виявляють амілоїд в біоптатах тканин і т.д.

ПОЛЯРИЗАЦІЙНА МІКРОСКОПІЯ

Дозволяє вивчати об'єкти дослідження в світлі, утвореному двома променями, поляризованими у взаємноперпендикулярних площинах, тобто в поляризованому світлі. Для цього використовують півчасті поляроїди або призми Ніколя, які поміщають в мікроскопі між джерелом світла і препаратом. Поляризація змінюється при проходженні (або відображенні) променів світла через різні структурні компоненти клітин і тканин, властивості яких неоднорідні. У так званих ізотропних структурах швидкість поширення поляризованого світла не залежить від площини поляризації, в анізотропних структурах швидкість його поширення змінюється в залежності від напрямку світла по поздовжній або поперечній осі об'єкта. Якщо показник заломлення світла вздовж структури більший, ніж в поперечному напрямку, виникає позитивне подвійне променезаломлення, при зворотних взаєминах - негативне подвійне променезаломлення. Багато біологічних об'єктів мають сувору молекулярну орієнтацію, є анізотропними та дають позитивне подвійне заломлення світла. Такими властивостями володіють міофібрили, вії миготливого епітелію, нейрофібрили, колагенові волокна і ін. Зіставлення характеру заломлення променів поляризованого світла і величини анізотропії об'єкту дозволяє судити про молекулярної організації його структури (рис. 2).

Принцип:

Орієнтоване (поляризоване) певним чином світло, потрапляючи на об'єкт, який має здатність до зміни орієнтації світлової хвилі, формує зображення об'єкта. Це зображення побудовано з відповідним об'єкту ступенем зміни орієнтації світла.

Ефект:

На темному тлі спостерігається яскраве чітке кольорове зображення об'єкта з високою роздільною здатністю і контрасту

Поляризаційна мікроскопія є одним з гістологічних методів дослідження, способом мікробіологічної діагностики, знаходить застосування в цитологічних дослідженнях і ін. При цьому в поляризованому світлі можна досліджувати як пофарбовані, так і нефарбовані і нефіксовані, так звані нативні препарати зрізів тканин.

Контрастування

В даний час традиційні методи контрастування зображення об'єкта (зміна різними способами інтенсивності світла, що проходить через об'єкт) реалізуються за допомогою додаткових вузлів, якими мікроскопи комплектуються на вимогу споживача, або які вбудовані в мікроскоп. Це відноситься, наприклад, до методів, в яких реалізується:

- косе освітлення,
- темне поле,
- фазовий контраст,
- диференційно-інтерференційний контраст (поєднання ефекту фазового контрасту і дослідження в поляризованому світлі).

Розглянемо коротко деякі, з наведених вище, методів контрастування мікрооб'єктів.

Метод темного поля

Метод темного поля в основному використовується для вивчення в світлі прозорих неабсорбуючих об'єктів, які неможливо спостерігати методом світлого поля. Найчастіше - біологічних, наприклад бактерій і найпростіших. У відбитому світлі можна також вивчати і непрозорі зразки, наприклад шліфи металів.

Принцип роботи наступний. Світло від освітлювача проходить через спеціальний конденсор темного поля, який формує пучок променів у вигляді порожнього конуса і направляє його на досліджуваний препарат. Основна частина променів проходить повз об'єктива, а зображення формується тільки світлом, розсіяним неоднорідною структурою зразка. В поле зору мікроскопа на темному тлі відображаються світлі ділянки структури препарату і великі частки зі світлими краями, що мають відмінний від навколишнього середовища показник заломлення.

Для проведення досліджень в темному полі необхідно використовувати мікроскопи особливої конструкції або спеціальні темнопольного конденсори, які встановлюються на місце штатного конденсора.

Приклад: Сканування краплі живої крові на **темнопольному мікроскопі:**

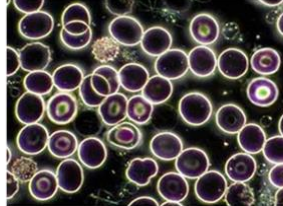
У цьому методі використовується той факт, що протягом близько 20 хвилин після забору окремої краплі крові клітини, що містяться в ній продовжують жити. Тому можна, використовуючи мікроскоп темного поля і працюючи на великому збільшенні, проводити спостереження за станом живої крові.

Конденсор темного поля дає можливість падати світлу на пробу крові з боку. Таким чином, клітини і різні компоненти світяться на темному тлі. Це дає можливість чітко побачити найдрібніші частинки, навіть менше клітини, які можна побачити в звичайний оптичний мікроскоп. Фон - темний, бо світло з конденсора проходить близько об'єктива, а не прямо через нього. Єдине видиме світло - це світло, відбите зі сторони і з поверхні частинок. Те, що видно, це світяться межі клітин або яскраві об'єкти (мікроорганізми, кристали і т.п.) на чорному тлі.

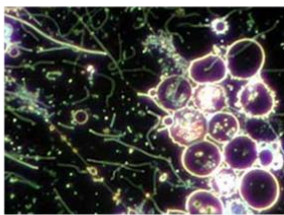


Нормальна кров

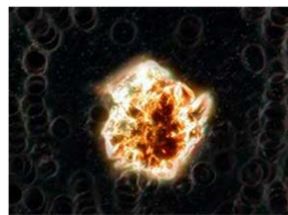
Клітини приблизно однакового розміру, що не склеюються одна з іншою.



Клітини у вигляді мішені. Показують погане засвоєння поживних речовин.



Хондрит: форма палички. Розпад червоних кров'яних клітин і вивільнення альбуміну і глобіну створюють волокнисті білки.



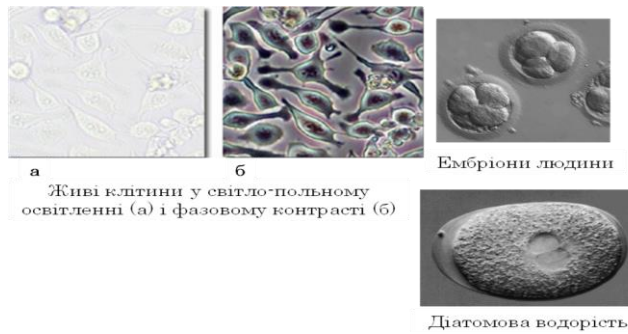
Червоні кристали. Містять актиноміцин і є показником інфекції в нижньому кишечнику.

Метод фазового контрасту

Переваги – можливість досліджувати живі клітини у їх природному стані, не вбиваючи їх та не вдаючись до пов'язування та забарвлення. В результаті динаміка біологічних процесів, що відбуваються у клітині може спостерігатися та фіксуватися із високим контрастом і розрішенням найдрібніших деталей зразку.

Суть методу : при проходженні світла через живу клітину фаза світлової хвилі змінюється згідно з коефіцієнтом рефракції клітини: світло, що проходить через відносно товсті ділянки клітини, такі, як ядро, затримується, і його фаза відповідно зсувається по відношенню до фази світла, що проходить через відносно тонкі ділянки цитоплазми.

В результаті між променями, що пройшли через об'єкт, і променями світлового фону виникає різниця довжини хвилі. Якщо ця різниця становить не менше $1/4$ довжини хвилі, то з'являється зоровий ефект, при якому темний об'єкт чітко видно на світлому тлі.

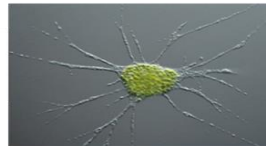


Диференційно-інтерференційний контраст

Інтерференційна мікроскопія вирішує ті ж завдання, що і фазово-контрастна. Але якщо остання дозволяє спостерігати лише контури об'єктів дослідження, то за допомогою інтерференційної мікроскопії можна вивчати деталі прозорого об'єкта і проводити їх кількісний аналіз. Це досягається завдяки роздвоєнню променя світла в мікроскопі: один з променів проходить через частку об'єкта, що спостерігається, а інший повз неї. В окулярі мікроскопа обидва променя з'єднуються і інтерферують між собою. Виникає різниця фаз можна виміряти, визначивши т. О. масу різних клітинних структур. Послідовне вимірювання різниці фаз світла з відомими показниками заломлення дає можливість визначати товщину живих об'єктів і нефіксованих тканин, концентрацію в них води і сухої речовини, вміст білків і т.д. На підставі даних інтерференційної мікроскопії можна побічно судити про проникності мембран, активності ферментів, клітинному метаболізмі об'єктів дослідження.



Інфузорія
тифелька



Дендритна
клітина

Зображення однієї і тієї ж клітини, отримане чотирма способами світлової мікроскопії

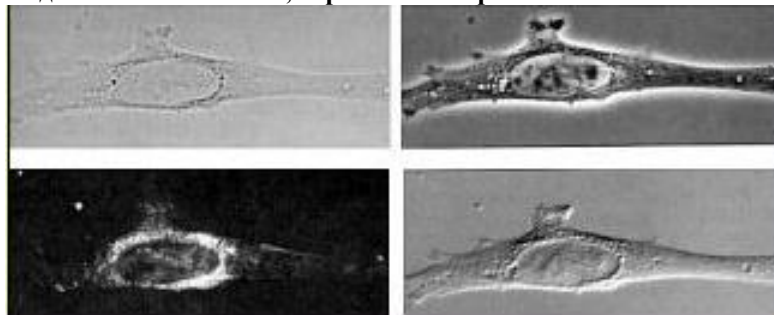


Рис. Фібробласт в культурі тканини при спостереженні за допомогою чотирьох різних типів світлової мікроскопії.

У лівому верхньому кутку - мікроскопія в світлому полі (зображення отримано при прямому проходженні променів через клітину);

Надалі за годинниковою стрілкою:

- Фазово-контрастна мікроскопія;
- Інтерференційна;
- Мікроскопія в темному полі.

Стереоскопічна мікроскопія

Для дослідження об'ємних об'єктів використовують **стереоскопічну** мікроскопію. Конструкція стереоскопічних мікроскопів дозволяє бачити об'єкт дослідження правим і лівим оком під різними кутами. Досліджують непрозорі об'єкти при відносно невеликому збільшенні (до 120 разів). Стереоскопічна мікроскопія знаходить застосування в мікрохірургії, в патоморфології при спеціальному вивченні матеріалу біопсії, операційного та секційного матеріалу, в судово-медичних лабораторних дослідженнях.



Морський хробак

Око креветки

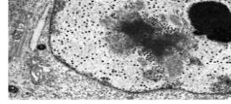
Електронна мікроскопія

Для вивчення на субклітинному і макромолекулярному рівнях структури клітин, тканин мікроорганізмів і вірусів використовують електронну мікроскопію. Вона застосовується в морфології, мікробіології, вірусології, біохімії, онкології, генетики, імунології. Різке підвищення роздільної здатності електронного мікроскопа

забезпечується потоком електронів, що проходять в вакуумі через електромагнітні поля, створювані електромагнітними лінзами. Електрони можуть проходити через структури досліджуваного об'єкта (трансмісійна електронна мікроскопія) або відбиватися від нього (скануюча електронна мікроскопія), відхиляючись під різними кутами, в результаті чого виникає зображення на люмінесцентному екрані мікроскопа. При трансмісійній (просвічуваній) електронній мікроскопії отримують площинне зображення структур (рис.), при скануючій - об'ємне (рис.).

При трансмісійній (просвічуваній) електронній мікроскопії отримують:

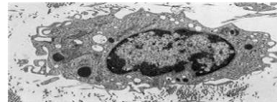
- ✓ **площинне зображення структур**



Специфічні аденовірусні включення в ядрі клітини через 24 години після інфектування аденовірусом



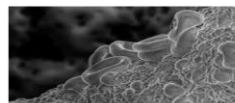
Зріз мітохондрії підшлункової залози



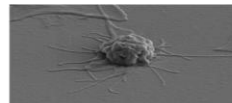
Макрофаг

При скануючій електронній мікроскопії отримують:

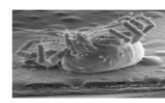
- ✓ **об'ємне**



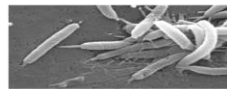
Фібриновий згусток у ірвові



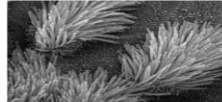
Активований тромбоцит з імобілізованим фібриногеном



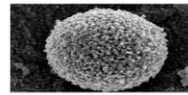
Кліщ



Хелікобактер



Епітелій з трахеї



Пилек рослини

Електронна мікроскопія вимагає спеціальної підготовки об'єктів дослідження, зокрема хімічної або фізичної фіксації тканин і мікроорганізмів. Біопсійний матеріал і секційний матеріал після фіксації зневоднюють, заливають в епоксидні смоли, ріжуть скляними або алмазними ножами на спеціальних ультратомах, що дозволяють отримувати ультратонкі зрізи тканин товщиною 30-50 нм. Їх контрастують і потім вивчають в електронному мікроскопі. У скануючому (растровому) електронному мікроскопі вивчають поверхню різних об'єктів, напильюючи на них у вакуумній камері електронно-щільні речовини, і досліджують так звані репліки, що повторюють контури зразка



Схематично показаний метод приготування репліки з поверхні зразка (підкреслення металом). Товщина шару металу визначається контуром поверхні вихідного зразка.

Для отримання зображення в електронному мікроскопі, що просвічує, використовують електрони, що проходять через зразок, а в скануючому електронному мікроскопі використовуються електрони, що розсіюються або випромінюються поверхнею зразка. В останньому випадку зразок повинен бути зафіксований, висушений і покритий тонкою плівкою важкого металу. Потім зразок сканується дуже вузьким пучком електронів. При цьому оцінюють кількість електронів, що розсіюються при опроміненні послідовних точок металевої поверхні. Отримане значення використовують для контролю інтенсивності другого променя, що рухається синхронно першому і формує зображення на телевізійному екрані. Таким чином відбувається формування єдиного, цілісного і значно збільшеного зображення.

Оскільки масштаби розсіювання електронів визначаються кутом поверхні по відношенню до променя, на зображенні виникають світлі і темні ділянки, що чергуються і створюють враження тривимірності

2. Методи дослідження біологічних об'єктів на тканиновому рівні

Організм людини і тварин являє собою цілісну систему, в якій можна виділити ряд ієрархічних рівнів організації живої матерії: клітини - тканини - органи - системи органів

Гістологія - наука про будову, розвиток і життєдіяльність тканин тварин організмів.

Тканини представляють собою систему клітин і неклітинних структур, які об'єдналися і спеціалізувалися в процесі еволюції для виконання найважливіших функцій в організмі. Для кожної з основних тканинних систем характерні властиві саме їм особливості будови, розвитку і життєдіяльності.

Цитологія - наука про розвиток, будову і життєдіяльність клітин.

Цитологія становить необхідну частину гістології, так як клітини є основою розвитку і будови тканин.

Головними етапами цитологічного і гістологічного аналізу є вибір об'єкта дослідження, підготовка його для вивчення в мікроскопі, застосування методів мікроскопіювання, а також якісний і кількісний аналіз зображень.

Об'єктами дослідження служать живі і мертві (фіксовані) клітини і тканини, і їх зображення, отримані в світлових і електронних мікроскопах.

Основним об'єктом дослідження є гістологічні препарати, приготовлені з фіксованих структур. Препарат може являти собою мазок (наприклад, мазок крові, кісткового мозку, слини, спинномозкової рідини та ін.), відбиток (наприклад, селезінки, тимуса, печінки), плівку з тканини (наприклад, сполучної або очеревини, плеври, м'якої мозкової оболонки), тонкий зріз. Найбільш часто для вивчення використовується зріз тканини або органу. Гістологічні препарати можуть вивчатися без спеціальної обробки. Наприклад, приготований мазок крові, відбиток, плівка або зріз органу можуть відразу розглядатися під мікроскопом. Але внаслідок того, що структури мають слабкий контраст, вони погано виявляються в звичайному світловому мікроскопі і потрібне використання спеціальних мікроскопів (фазово-контрастні і ін.). Тому частіше застосовують спеціально оброблені препарати: фіксовані, укладені в тверде середовище і пофарбовані.

Процес виготовлення гістологічного препарату для світлової та електронної мікроскопії включає наступні основні етапи:

1. взяття матеріалу і його фіксація,
2. ущільнення матеріалу,
3. приготування зрізів,
4. фарбування або контрастування зрізів.

Для світлової мікроскопії необхідний ще один етап - укладання зрізів в бальзам або інші прозорі середовища.

Фіксація забезпечує запобігання процесів розкладання, що сприяє збереженню цілісності структур. Це досягається тим, що взятий з органу маленький зразок або занурюють в фіксатор (спирт, формалін, розчини солей важких металів, осмієва кислота, спеціальні фіксуючі суміші), або піддають термічній обробці. *Під дією фіксатора в тканинах і органах відбуваються складні фізико-хімічні зміни. Найбільш істотним з них є процес незворотної коагуляції білків, внаслідок якого життєдіяльність припиняється, а структури стають мертвими, фіксованими. Фіксація призводить до ущільнення і зменшення обсягу шматочків, а також до поліпшення наступного фарбування клітин і тканин.*

Ущільнення матеріалу, необхідне для приготування зрізів, проводиться шляхом просочування попередньо зневодненого матеріалу парафіном, целлоїдин, органічними смолами. Більш швидке ущільнення досягається застосуванням методу заморожування шматочків, наприклад, в рідкій углекислоті.

Приготування зрізів відбувається на спеціальних приладах - мікротомів (для світлової мікроскопії) і ультрамикротомов (для електронної мікроскопії).

Фарбування зрізів (в світловій мікроскопії) або напилення їх солями металів (в електронній мікроскопії) застосовують для збільшення контрастності зображення окремих структур при розгляданні їх під мікроскопом.

Гістологічні барвники (по хімічній природі) підрозділяють на кислі, основні і нейтральні. Як приклад можна привести найбільш уживаний барвник гематоксилін, який забарвлює ядра клітин в фіолетовий колір, і кислий барвник - еозин, що забарвлює цитоплазму в рожево-жовтий колір. Виборча спорідненість структур до певних барвників обумовлено їх хімічним складом і фізичними властивостями. Структури, добре забарвлюються кислими барвниками, називаються Оксифільні, а забарвлюються основними - базифільними. Наприклад, цитоплазма клітин найчастіше забарвлюється Оксифільні, а ядра клітин - фарбуються базифільно.

Структури, що сприймають як кислі, так і основні барвники, є нейтрофільними (Гетерофільні).

Пофарбовані препарати зазвичай зневоднюють в спиртах зростаючої концентрації і прояснюють в ксилолі, бензолі, толуолі або деяких маслах. Для тривалого збереження зневоднений гістологічний зріз укладають між предметним і покривним склами в канадський бальзам або інші речовини. Готовий гістологічний препарат може бути використаний для вивчення під мікроскопом протягом багатьох років.

КУЛЬТУРА ТКАНИН

Метод тривалого зберігання у живому стані клітин, тканин, невеликих органів або їх частин, що виділені з організму людини, тварин або рослин

Ізольований шматочок тканини або органу, який використовується для культивування поза організмом, називається експлантатом. Культура клітин росте поза організмом без утворення тканин.

У біол. дослідженнях частіше застосовують **одношарові** К. т. - популяції клітин, що ростуть на поверхні твердого субстрату (скло, метал, пластмаса) у вигляді безперервного шару, і **суспензійні** К. т., в яких клітини зберігають життєздатність або розмножуються зваженими в поживному середовищі.

Залежно від ступеня пристосування до умов культивування розрізняють п'ять типів культур клітин:

- 1) первинна культура клітин, що отримується з тканин або органів, узятих безпосередньо з організму (культура вважається первинною до тих пір, поки її не пересіяли), лінія клітин - первинна культура з часу отримання субкультури (пересіву);
- 2) стабільна лінія клітин - клітини, здатні розмножуватися (пересіватися) *in vitro* до нескінченності;
- 3) лінія диплоїдних клітин - лінія клітин, в якій не менше 75% клітин зберегли нормальний вихідний каріотип;
- 4) штам клітин - популяція однорідних за однією або декількома ознаками диплоїдних клітин, яка зберігає специфічні властивості протягом певного періоду (до 50 пасажів).
- 5) Надалі штам клітин або гине, або перетворюється в стабільну лінію клітин; при цьому нормальний каріотип змінюється гетероплоїдним набором хромосом.

У первинних к. т. зберігається тканинна специфічність клітин. Цим пояснюється морфологічна неоднорідність таких к. т..

При тривалому культивуванні тканинна специфічність клітин виражена слабо, тому клітини багатьох ліній подібні між собою.

При культивуванні найбільш вибагливі к.т. теплокровних тварин, найменш - к. т. рослин.

Для вирощування культур, крім факторів харчування, необхідні відповідні температура, осмотичний тиск, рН, іонний і газовий склад середовища.

Для клітин більшості ссавців і птахів оптимальна t 36- 38 ° С, для клітин комах і холоднокровних хребетних - 20- 25 ° С. Для клітин ссавців і птахів оптимальний осмотичний тиск при t 38 ° С - 7,6 атм. Клітини більшості тварин добре ростуть при рН 7,0-7,3. Оптимальна концентрація O_2 к. т. близька до змісту його в повітрі.

У живильному середовищі повинні бути присутніми іони натрію, калію, кальцію, магнію, хлориди, фосфати і глюкоза. Потреба в поживних речовинах визначається характером к. т. Для тривалого зростання і розмноження клітин ссавців потрібно щонайменше 13 амінокислот, вітаміни групи В і сироватка крові.

Середовища для короточасного культивування к. т. можуть містити менше поживних речовин, в їх склад не входить сироватка. Поживні середовища, які забезпечують зростання к. т., називаються **ростовими**; середовища, що забезпечують збереження життєздатності к. т., - **підтримуючими**.

Первинні культури отримують з клітин, виділених з тканин за допомогою протеолітичних ферментів (частіше трипсину). Їх, як правило, вирощують у середовищі, що складається з сольового розчину Ерла або Хенкса, 0,5% гідролізату лактальбуміну, 0,1% глюкози і 5-10% сироватки крові великої рогатої худоби.

Для вирощування лінії клітин і штаму клітин використовують синтетичні середовища, що містять амінокислоти, вітаміни і збагачені сироваткою (середовище Ігла і ін.) і ін. важливими метаболітами (середовище 199 і ін.). Такі ж середовища застосовують при тривалому культивуванні тканин і органів зародків. К. т. вирощують в скляних, пластмасових або металевих судинах різної форми і ємності. Одношарові культури частіше вирощують в скляних пробірках, матраках Ру або в круглостінних флаконах.

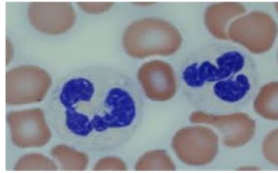
3. Принципи і методи гістохімічного фарбування. Основи імуноцитохімічного аналізу

Гістохімічні методи дослідження - методи ідентифікації хімічних речовин в гістологічних зрізах. Складовою частиною г. м. д. є цитохімічні методи, що виявляють хімічні речовини в клітинах приготованих мазків і відбитків. В основі г. м. д. лежить з'єднання принципів і методів хімічного аналізу з принципами та методами морфологічного вивчення клітин і тканин, що використовуються в цитології і гістології.

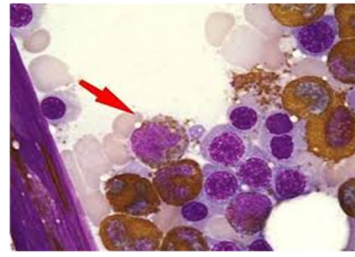
За допомогою різноманітних методів сучасної гістохімії можна судити про особливості функціонування різних тканинних і клітинних структур, визначати характер і темп обмінних процесів в клітинах і тканинах, виявляти ранні прояви захворювань.

Неодмінною умовою проведення г. м. д., особливо при виявленні ферментів і інших речовин білкової природи, є збереження структури тканин і клітин в стані, близькому до того, яке є в живому організмі. Це досягається отриманням зрізів свіжозаморожених тканин за допомогою ножа глибокого охолодження і кріостату, а також використанням ліофільної сушки. Деякі г. м. д., наприклад виявлення вуглеводневих сполук, можна проводити після спеціальної фіксації тканин і заливки в парафін.

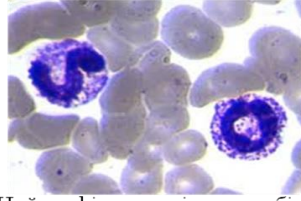
До високоспецифічних відносяться гістохімічні методи виявлення **ферментів**. В їх основу покладено **вплив ферменту на специфічний субстрат в присутності іншої речовини**, що називається захоплюючим агентом (акцептором). З'єднуючись з первинним продуктом ферментативної реакції, акцептор утворює нерозчинний, зазвичай забарвлений, осад - кінцевий продукт реакції, який маркує місце дії ферменту. Як акцептори застосовують іони металів, солі діазонію та інші сполуки. Оцінка результатів гістохімічних реакцій, заснована на виборчому фарбуванні структур або випаданні пофарбованого продукту реакції, може бути не тільки якісною, але і кількісною при використанні цито-спектрофотометрії. Можлива також візуальна напівкількісна оцінка інтенсивності фарбування в балах.



Нейтрофіли – фарбування за Романовським-Гімзе



Нейтрофіли з мієлопероксидазою (барвник бензидин)



Нейтрофіли з катіонними білками (барвник бромфеноловий синій)

ЛЕКЦІЯ № 5
БІОХІМІЧНИЙ СКЛАД КРОВІ

План:

1. Загальна характеристика речовин крові
2. Білки крові.
3. Ферменти
4. Глюкоза в крові.
5. Пігменти
6. Низькомолекулярні азотисті речовини
7. Показники ліпідного обміну
8. Мінеральні складові частини крові

1. Загальна характеристика речовин крові

Кров на 55% складається з плазми і на 45% - з формених елементів, які знаходяться в ній в підвищеному стані.

Плазма - це складне біологічне середовище, що містить 92% води, 7% білка і 1% жирів, вуглеводів і мінеральних солей.

Біохімічний аналіз передбачає лабораторне дослідження наступних показників аналізу крові:

- Білки
- Ферменти
- Ліпіди
- Вуглеводи
- Пігменти
- Низькомолекулярні азотисті речовини
- Неорганічні речовини і вітаміни

Пакетні дослідження:

Діагностика серцево-судинної системи: креатинфосфокіназа-МВ; ЛДГ (лактатдегідрогеназа); Тропонін І; Д-димер; С-реактивний білок	Тіреоїдна панель: Т3 (трийодтіронін) вільний Т4 (тіроксин) вільний Т3 загальний Т4 загальний ТТГ АТ-ТГ -АТ-ТПО
Репродуктивна панель: ФСГ; ЛГ; пролактин; Естрадіол; Прогестерон; Тестостерон; Андростендіон та ін.	Пренатальна панель: - ХГЧ (хоріонічний гонадотропін) загальний; АФП (альфафетопротеїн); плацентарний лактоген; ін.
Діагностика цукрового діабету глюкоза; Глікований гемоглобін; С-пептид; інсулін; Ін.	Ревмокомплекс: - білкові фракції; - Асл-О (антистрептолізин-О); С-реактивний білок; - ревматоїдний фактор; -АТ-ТПО

Печінковий комплекс: Аланінамінотрансфераза (АЛТ), аспартатамінотрансфераза (АСТ). Гама-глутамілтрансфераза (ГГТ). Лужна фосфатаза (ЛФ). Білірубін (загальний, прямий, непрямий). Білок загальний. Альбумін.	Нирковий комплекс: - Креатинін; - Сечовина; - Сечова кислота
Ліпидограма Загальний холестерин Тригліцериди; ЛПНЩ; ЛПВЩ;	Контроль анемії: Залізо; Еритропоетин; Феритин; Трансферин;

Існують певні норми біохімічного аналізу крові — тобто кількість показників, яка повинна бути присутньою в крові людини певного віку та статі. Це статистично встановлені показники здорових людей. Відхилення від цих показників — симптом різноманітних порушень у діяльності організму, збій в роботі певних органів або систем.

2. БІЛКИ КРОВІ

Білки плазми (сироватки) крові представляють собою високомолекулярні азотумісні сполуки. Вони мають складну будову, до їх складу входить більше 20 амінокислот.

Функції:

1. Участь у водному обміні.
При зменшенні кількості білків (або зниження їх гідрофільності) в плазмі відбувається:
 - Надлишок «вільної» води;
 - Збільшується гідростатичний тиск у капілярах;
 - Вода просочується крізь стінки капілярів у тканини;
 - Утворюються набряки (виникнення набряків може бути й з інших причин)
2. Участь у процесі згортання крові.
3. Пов'язування і транспорт різних біологічних сполук.
4. Підтримання постійності гомеостазу – кислотно-основного стану крові.
5. Захист організму від проникнення чужорідних елементів, у тому числі чужорідних білків.

У клінічній практиці визначають загальний вміст білка в плазмі крові та його фракції.

Загальна кількість білка в плазмі крові складає 65-85 г/л

У сироватці крові білка на 2-4 г/л менше, ніж у плазмі через відсутність фібриногену.

Зниження білка – гіпопротеїнемія,

Збільшення білка – гіперпротеїнемія

Гіпопротеїнемія виникає внаслідок:

- недостатнього надходження білка в організм (тривале голодування, безбілкова дієта, порушення діяльності шлунково-кишкового тракту);
- Підвищеної втрати білка (гострі і хронічні кровотечі, злоякісні новоутворення; виразна гіпопротеїнемія – постійний симптом нефротичного синдрому при багатьох захворюваннях нирок, пов'язаний з виділенням із сечею великої кількості білка);
- порушення утворення білка (недостатність печінки – гепатити, цирози, дистрофії).

Гіперпротеїнемія розвивається внаслідок дегідратації (зневоднення) - втрати частини внутрішньосудинної рідини. Відбувається при перегріванні організму, великих опіках, важких травмах, деяких захворюваннях (холері).

Сучасними методами дослідження вдалося ідентифікувати понад 100 різних білків плазми.

Найбільш прості білки - **альбуміни, глобуліни і фібриноген** - знаходяться в плазмі у великих кількостях, інші - в мізерно малих.

Альбуміни складають більшу частину білків плазми. Вони добре утримують воду, на їх частку припадає до 80% колоїдно-осмотичного тиску крові.

Глобуліни.

А) Збільшення вмісту **α -глобулінів** спостерігається при запальних процесах (ревматизм), стресових впливах на організм (травми, опіки, інфаркт міокарда та ін.).

Це білки так званої гострої фази. Ступінь збільшення **α -глобулінів** відображає інтенсивність процесу.

Зменшення **α -глобулінів** відмічається при пригніченні їх синтезу в печінці, гіпотиреозі - зниженій функції щитовидної залози.

Б) **β -глобуліни**. У цій фракції присутні ліпопротеїди, тому кількість **β -глобулінів** збільшується при гіперліпопротеїдемії. Це спостерігається при атеросклерозі, цукровому діабеті, гіпотиреозі, нефротичному синдромі.

В) Підвищення **γ -глобулінів** спостерігається при посиленні імунних процесів. Зумовлено підвищеною продукцією ІГ класів G, A, M, D, E (гострі і хронічні вірусні, бактеріальні, паразитарні інфекції, захворювання сполучної тканини (колагенози), злоякісні захворювання крові, деякі пухлини, хронічні активні гепатити, цирози печінки).

3. ФЕРМЕНТИ

1. Ферменти, що функціонують (власне плазмові)

Ренін (підвищує артеріальний тиск через ангіотензин II), холінестераза (розщеплює ацетилхолін). Їх активність вище в плазмі крові, ніж в тканинах. Підвищення або зниження їх активності має значення в діагностиці.

2. Ферменти, що не функціонують (плазмонеспецифічні).

З'являються в плазмі крові з клітин тканин і органів. У крові не виконують будь-якої функції, а виконують її в тканинах. Це внутрішньоклітинні ферменти. Їх активність в плазмі значно нижче, ніж в тканинах. Напр., АЛТ, АСТ, ГГТП (гама-глутаміл-транспептидаза), лужна фосфатаза (ЛФ). Найчастіше спостерігається підвищення їх змісту, ніж зниження.

Причини гіперферментемії:

- 1) підвищення проникності біомембран;
- 2) цитоліз;
- 3) некроз тканин;
- 4) посилення синтезу.

АлАТ (аланінамінотрансфераза), 0,1-0,68 ммоль / год • л.

Підвищення активності АлАТ при захворюваннях печінки, скелетних м'язів, міокарда. Це цитоплазматичний фермент. Активність його підвищується в ранні стадії захворювання.

АсАТ (аспартатамінотрансфераза), 0,1-0,45 ммоль / год • л. Найбільший вміст в м'язах (скелетна, серцева), в печінці та ін. АСТ міститься не тільки в цитоплазмі, але і в мітохондріях, тому її поява свідчить про більш глибокі пошкодження.

Підвищення активності АсАТ при захворюваннях м'язів, травмах, запаленнях, а також при захворюваннях міокарда, печінки. При захворюванні печінки підвищення АсАТ, рівне підвищення АлАТ, означає глибоке ушкодження.

ЛФ (лужна фосфатаза) в нормі 0,5-1,3 ммоль / год • л.

Джерела ЛФ:

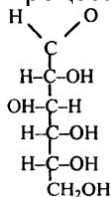
- 1) кісткова тканина (синтезується остеобластами);
- 2) жовчовивідна система (синтезується епітелієм жовчних протоків).

ЛФ підвищується при захворюваннях кісткової системи, метастазах пухлин в кісткову тканину, рахіті, остеопорозі.

α -амілаза синтезується в підшлунковій залозі і в слинних залозах. У крові підвищується при панкреатитах, рідше при запаленні слинних залоз.

4. ГЛЮКОЗА В КРОВІ

Глюкоза є найважливішим енергетичним матеріалом і використовується в багатьох процесах організму.



Норма глюкози в крові від 3,3 до 5,5 ммоль / л.

Іноді рівень глюкози висловлюють в **мг%** (в деяких глюкозоаналізаторах і наборах тест-смужок). Перерахунок з однієї розмірності в іншу можна здійснити за допомогою формул:

- рівень глюкози (мг%) = рівень глюкози (ммоль/л) $\times 18$;
- рівень глюкози (ммоль/л) = рівень глюкози (мг%): 18.

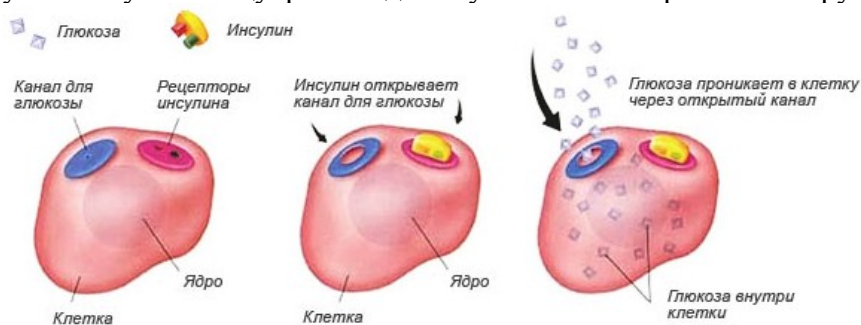
Рівень нижчий за норму (**гіпоглікемія**) - розвиваються серйозні зміни з боку головного мозку, аж до розвитку коми.

Виникає : 1) у хворих на цукровий діабет, які вводять інсулін або приймають цукрознижувальні таблетки, які порушують режим харчування або рухову активність: пропуски в прийомі їжі, надмірне фізичне навантаження, вживання алкоголю.

2) у здорових людей при тривалому голодуванні,

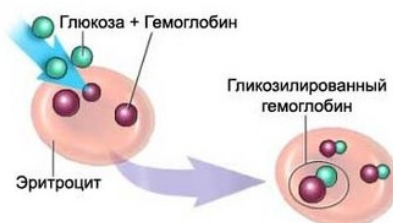
3) у хворих при порушенні всмоктування вуглеводів, хронічних хворобах печінки і деяких ендокринних захворюваннях (недостатність функції гіпофіза, надниркових залоз, щитовидної залози). Іноді у людей, які страждають захворюваннями ЦНС: поширеному атеросклерозі судин головного мозку, наслідки інсультів.

Підвищення рівня глюкози в крові (**гіперглікемія**) практично завжди свідчить про розвиток у обстежуваного цукрового діабету або менш виражених порушень обміну вуглеводів.



ГЛІКОЗИЛЬОВАНИЙ ГЕМОГЛОБІН

Гемоглобін знаходиться в еритроциті і має в своєму складі білковий компонент - **глобін**, що вступає в незворотній зв'язок із глюкозою в крові. Процес утворення такого зв'язку називається **глікозилюванням**, а "продукт", який утворюється, отримав назву **глікозилюваного гемоглобіну HbA1c** (норма 4-6%).



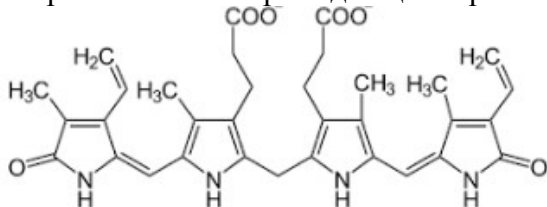
Так як кількість утвореного HbA1c прямо пропорційна концентрації глюкози в крові і тривалості "зіткнення" глюкози і еритроцитів, даний показник відображає стан вуглеводного обміну людини за останні 90-120 днів (середня тривалість життя еритроцита в організмі). По суті, HbA1c відповідає середньому рівню глюкози крові за 3 місяці, тому використовується лікарями як один з основних показників, що відповідає на питання: добре чи ні був компенсований цукровий діабет за останні місяці.

5. ПІГМЕНТИ

Білірубін

Білірубін утворюється в клітинах ретикулоендотеліальної системи (які є в кістковому мозку, печінці, селезінці) при розпаді гемоглобіну.

Вміст білірубину в крові в нормі становить 8,5-20,5 мкмоль / л. Жовтяничне забарвлення шкіри з'являється при підвищенні рівня білірубину більше 34 мкмоль / л.



Збільшення вмісту білірубину в крові (гіпербілірубінемія) відбувається в результаті:

- збільшення інтенсивності гемолізу – розпаду еритроцитів (гемолітичні анемії, малярії, масивних крововиливах у тканини, інфаркті легені, синдромі розтрошення тканин)
- ураження паренхіми (тканини) печінки (гострі і хронічні гепатити, цироз, рак печінки, ехінокоз, абсцес (гнійник);
- порушення відтоку жовчі з печінки і жовчних шляхів в кишечник (камінь, пухлина).



- Жовтяниця у новонароджених:

При внутрішньоутробному розвитку неможливо самостійне дихання, тому доставкою кисню займаються еритроцити. У кожній клітині міститься плодовий гемоглобін, який після народження немовляти починає руйнуватися. Процес розпаду супроводжується яскравим утворенням білірубину. З цієї причини рівень пігменту у новонароджених дітей завжди високий.

Розпадаючись, плодовий гемоглобін утворює непрямий білірубін. Самостійно з організму немовляти він не виведеться, поки не утвориться його розчинна форма, яка називається прямим пігментом. У дітей, що народилися на світ раніше покладеного терміну, спостерігається жовтяниця, оскільки організмом не виводиться пігмент так швидко, як це відбувається у доношених немовлят.

Фізіологічна жовтяниця - не представляє для новонародженого небезпеки, зустрічається в 7% випадків. Симптоми помітні на 2 добу після народження, а через пару тижнів від них і сліду не залишається.

Розвивається внаслідок:

- недоношеності новонароджених
- захворювань у мами при вагітності
- цукрового діабету у породіллі
- кисневого голодування на етапі внутрішньоутробного розвитку
- асфіксії у новонароджених після народження

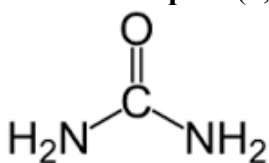
Патологічна жовтяниця - вважається небезпечною формою, виникає через:

- наявності резус-конфлікту при вагітності
- несумісності груп крові немовляти і мами
- інфекційних хвороб печінки у новонароджених
- спадкових руйнувань червоних кров'яних клітин
- кишкової непрохідності у крихти (через підвищений вміст в калі білірубину)
- передчасних пологів
- незначних крововиливів у новонародженого
- стимуляції пологів
- гормональні збої у дитини
- печінкової дисфункції у малюка

Рівень пігменту вище покладеного небезпечний для дітей. Білірубін в повному обсязі блокується білком крові, тому існує ризик його потрапляння в ЦНС. А для незміцнених нервових клітин білірубін отруйний.

6. НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ АЗОТИСТІ РЕЧОВИНИ

Сечовина крові (2,5-8,3 ммоль/л.)



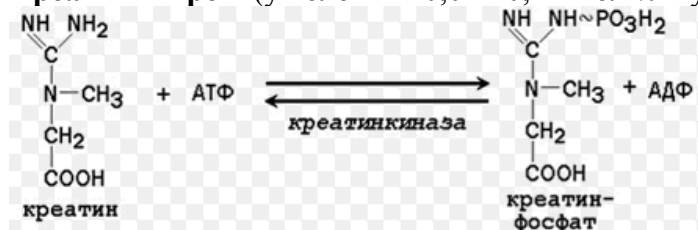
Підвищення - при споживанні великої кількості білкової їжі, запальних, пухлинних процесах з розпадом білків. Надлишок сечовини швидко видаляється з організму нирками.

Тривале виявлення сечовини крові на рівні 7 ммоль/л - прояв ниркової недостатності.

При тяжкій нирковій недостатності рівень сечовини в крові може досягати дуже великих цифр, перевищуючи норму в 20-30 разів.

Зниження при печінкової нестачі, що пов'язано з порушенням синтезу сечовини в печінці.

Креатинін крові (у чоловіків 0,044-0,1 ммоль/л і у жінок - 0,044-0,088 ммоль/л).



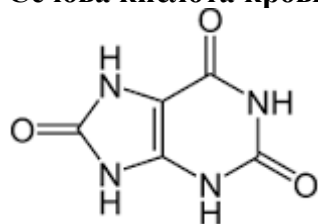
Використовується для вивчення функції нирок (виявлення ниркової недостатності).

Підвищення вмісту креатиніну відбувається паралельно наростанню азотемії

При тяжкому порушенні функції нирок вміст у крові креатиніну може досягати дуже високих цифр - 0,8-0,9 ммоль/л.

Зменшення вмісту креатиніну в крові діагностичного значення не має.

Сечова кислота крові (у чоловіків 0,24-0,50 ммоль / л, у жінок 0,16-0,40 ммоль / л).



Є продуктом обміну пуринових основ, що входять до складу складних білків - нуклеопротейдів.

Гіперурикемія - підвищений вміст сечової кислоти в крові - ознака подагри; також при лейкозах, В12-дефіцитній анемії, іноді деякі гострі інфекції (пневмонія, черевний тиф, бешиха, туберкульоз), при захворюваннях печінки і жовчовивідних шляхів, важкій формі цукрового діабету, хронічній екземі, псоріазі, кропив'янці, при отруєнні окисом вуглецю, метанолом.

7. ПОКАЗНИКИ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ

Серцево-судинні захворювання займають провідне місце по причині смерті в світі. Одним з механізмів розвитку патології серця є зміна стінок судин і утворення на них так званих атеросклеротичних бляшок. Ці утворення являють собою ділянку стінки, просоченої ліпидоподібними речовинами або жирами - **холестерином і тригліцеридами**. Провідним чинником розвитку цього процесу є високий рівень жироподібних речовин в крові, тому в рамках діагностики серцево-судинних і обмінних захворювань досить часто проводять дослідження **ліпідограми**.

Головними ліпідами крові є холестерин і тригліцериди.

Жироподібні речовини не розчиняються у воді, яка є основою плазми крові.

У зв'язку з цим для транспорту подібних з'єднань необхідні білки:

Жироподібні речовини+білки=ліпопротейди

Вони здатні переноситися з потоком крові до тканин.

Ліпопротейди → особливі рецептори на внутрішній поверхні судин → поглинання

Щільність білка наближається до щільності води, питома вага ліпідів набагато менша, т.ч. співвідношення кількості цих двох компонентів ліпопротейдного комплексу впливає на його середню щільність.

На цій основі була розроблена методика класифікації ліпопротейдів на фракції.

В рамках визначення ліпідограми з'ясовується кількість холестерину в кожній фракції (що відображає загальну кількість певного типу ліпопротейдів), а також загальна кількість холестерину і тригліцеридів. На основі отриманих даних обчислюється ще один важливий показник ліпідограми - коефіцієнт атерогенності.

Показники, які визначаються:

- Загальний холестерин;
- Тригліцериди;
- Ліпопротейди низької щільності (ЛПНЩ);

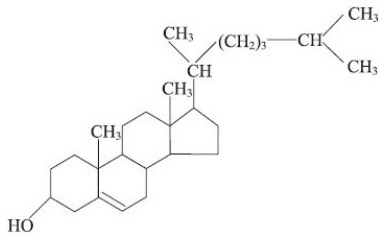
- Ліпопротеїди високої щільності (ЛПВЩ);
- Ліпопротеїди дуже низької щільності (ЛПДНЩ);
- Коефіцієнт атерогенності.

З жироподібних речовин будуються клітинні мембрани всіх клітин; ліпіди - продуктивне джерело енергії; вони з кров'ю транспортуються з кишечника в тканини і з «запасів» організму до місця їх споживання.

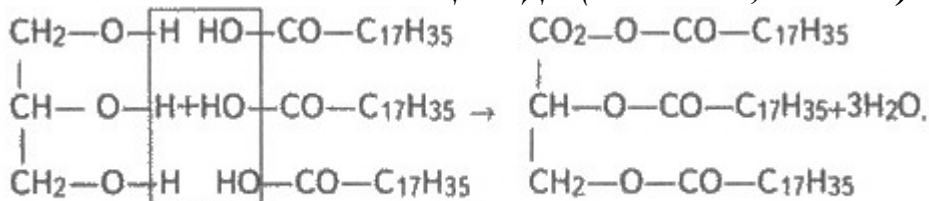
Тому діагностичну цінність має не саме виявлення ліпідів у крові, а перевищення ними рівня допустимих норм.

ХОЛЕСТЕРИН (не більше 5,15 ммоль/л):

- 1) екзогенний, обумовлений вживанням жирних продуктів,
- 2) ендогенний, утворений всередині самого організму. При деяких порушеннях обміну речовин його утворення йде швидше звичайного, що і сприяє його підвищенню в крові. Грає роль у розвитку атеросклерозу і інших порушень метаболізму.



ТРИГЛЦЕРИДИ (не більше 1,7 ммоль/л):



Гліцерин Стеаринова кислота Стеариновий тригліцерид

Рівень тригліцеридів зазвичай знаходиться в рівновазі з кількістю холестерину. Тобто, їх зростання при різних патологічних станах відбувається практично одночасно. Такий взаємозв'язок виникає через те, що ці два жироподібних з'єднання переносять практично одні й ті ж самі типи ліпопротеїдів.

Абсолютні значення як холестерину, так і тригліцеридів безпосередньо залежать від числа ліпопротеїдів, що містять ці речовини.



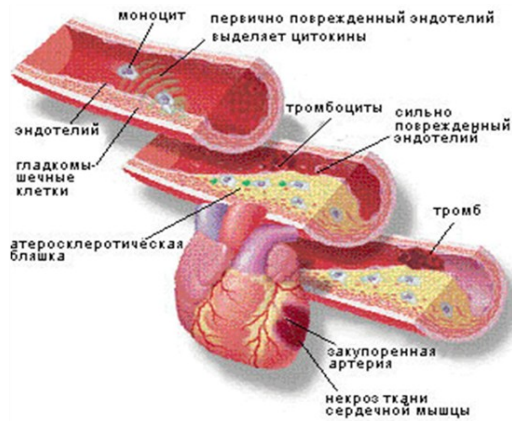
Серед них є корисні (ЛПВЩ) і більш шкідливі фракції (ЛПНЩ).

ЛПНЩ (не більше 2,6 ммоль/л):

Кількість жирів в них перевищує кількість білка, що і призводить до більш низькій питомій вазі або щільності.

ЛПНЩ транспортує холестерин з печінки в клітини і тканини.

Рецепторів, які служать посадковим майданчиком для ЛПНЩ в клітинах досить мало, тому при зайвому їх утворенні (незбалансоване харчування, ендокринні захворювання, патологія нирок) вони не встигають проникати і перероблятися в тканинах і накопичуються в крові. При деякій критичній концентрації вони здатні просочувати слабкі місця судинної стінки і викликати розвиток атеросклеротичної бляшки. Саме рівень даної фракції ліпопротеїдів вносить найбільший вклад у кількість загального холестерину.



Жир прилипає до стінок судин, збираючи усе сміття до тих пір, доки не відбудеться повне закупорення судини. Якщо це відбувається у серці – інфаркт, якщо у мозку – інсульт.

ЛПВЩ (найбільш дрібні серед ліпопротеїнів, 8-11 нм в діаметрі):

Антиатерогенна дія ЛПВЩ проявляється завдяки їх здатності захоплювати холестерин, виводити його з клітин, тканин, в тому числі стінок артерій, і транспортувати назад у печінку.

Високоспецифічні рецептори ЛПВЩ виявлені на клітинах гладеньких м'язів і фібробластах. Кількість цих рецепторів збільшується при підвищенні концентрації холестерину в клітці. Зв'язування ЛПВЩ з рецепторами викликає викид холестерину з клітин. Спочатку холестерин вбудовується в оболонку ЛПВЩ, потім етерифікується і переміщається в серцевину ЛПВЩ. У печінці ЛПВЩ зв'язуються з рецепторами і руйнуються

Високі значення ЛПВЩ зменшують ризик розвитку бляшок у судинах, так як сприяють видаленню надлишкового холестеролу з організму. Зниження ЛПВЩ навіть при нормальному рівні загального холестерину і його фракцій веде до прогресування атеросклерозу. Високі значення (низький ризик розвитку атеросклерозу) - більше 1,6 ммоль / л у осіб обох статей. Коефіцієнт атерогенності (співвідношення між «поганим» і «добрим» холестерином).

$$КА = \frac{ХС_{загальний} - ХС_{ЛПВЩ}}{ХС_{ЛПВЩ}} = \frac{ЛПНЩ + ЛПДНЩ}{ЛПВЩ}$$

Нормальне значення цього показника становить приблизно 2,2-3,5. Підвищення коефіцієнта говорить про превалювання шкідливих типів ліпопротеїдних комплексів, що підвищує ризик розвитку атеросклерозу.

8. МІНЕРАЛЬНІ СКЛАДОВІ ЧАСТИНИ КРОВІ

Вміст у крові мінеральних складових частин відрізняється великою постійністю, ніж органічних. Вони знаходяться в крові в іонізованому стані, а також у вигляді недисоційованих молекул і в з'єднаннях з колоїдами, переважно з білками.

Кальцій: сироватка - 9 - 11 мг%, цільна кров - 6 - 7 мг%,

Підвищення (гіперкальціємія) в сироватці: при підвищеному виділенні гормону паращитовидних залоз і при надмірному введенні в організм вітаміну D.

Зменшення вмісту загального та іонізованого кальцію пов'язано зазвичай з гіпофункцією епітеліальних тілець; при цьому вміст калію підвищений.

Калій: сироватка 15 - 25 мг%, цільна кров - 160 - 200 мг%.

Зміни коефіцієнта К / Са нерідко залежать від порушення діяльності вегетативної нервової системи. Кальцій має відношення до функції симпатичної, а калій парасимпатичної нервової системи

Натрій: в цільній крові 170 - 250 мг% , в плазмі 300 - 350 мг%.

Знижується: при лихоманці, анеміях і деяких інших захворюваннях крові, при захворюваннях надниркових залоз, зокрема хворобі Аддісона, так як мінералокортикоїди впливають на обмін натрію. Зниження коефіцієнта Na / К вказує на недостатність надниркових залоз. Вміст натрію в крові піддається значним коливанням при набряках.

Деяке **збільшення** натрію спостерігається при вагітності.

Хлор: в цільній крові 270 - 320 мг%, а в плазмі 350 - 380 мг%.

Бере участь в обміні головним чином в поєднанні з натрієм (NaCl).

Зростання: при гідремії і при інфекційних захворюваннях.

Зменшення: при кишковій непрохідності, при деяких захворюваннях нирок, внаслідок затримки хлору в тканинах, а також при блювоті, коли організм з блювотними масами втрачає багато соляної кислоти.

Фосфор неорганічний: в плазмі 3 - 4,5 мг%.

Невелике **зменшення:** в плазмі відзначено при вагітності і пов'язане, можливо, з процесами розвитку кісток плоду; при рахіті.

Фосфати **підвищуються** в крові при м'язовій роботі, а також під впливом вітаміну D, при уремії. В організмі є кілька підвидів **заліза**: транспортний, функціональний і депонований. Більша його частина знаходиться в крові (гемоглобін) і після розпаду еритроцитів і гемоглобіну, знову використовується. Організм самостійно контролює баланс концентрації заліза в різних відділах шляхом переміщення. Рівень заліза в крові підтримується шляхом постійного виведення надлишків і засвоєння нового заліза з їжі.

Анемії характеризуються **зменшенням** вмісту заліза в крові.

Підвищення сироваткового залізо спостерігається у пацієнтів з хронічними захворюваннями печінки, хронічними нирковими недостаточностями, деякими видами анемії, інфекціями і гемохроматозом (порушення процесів обміну заліза і відкладенням його надлишків в тканинах)

Лекція № 8
Статистичний аналіз даних

План

1. Статистичний аналіз, класифікація методів статистичного аналізу
2. Описова статистика
 - 2.1 Частотний розподіл
 - 2.2 Відсоткові показники
 - 2.3 Заходи центральної тенденції
 - 2.4 Міри розкиду даних
3. Методи вторинної статистичної обробки результатів
 - 3.1 Методи порівняння елементарних статистик (параметричні та непараметричні методи)
 - 3.2 Кореляційний аналіз
4. Роль і значення графічного методу в статистиці

1. Статистичний аналіз, класифікація методів статистичного аналізу

Статистика - це точна наука, що вивчає методи збору, аналізу і обробки даних, які описують масові дії, явища і процеси. Дані, що вивчаються в статистиці, зачіпають не окремі об'єкти, а їх сукупності.

Статистика в біології та медицині є одним з інструментів аналізу експериментальних даних і клінічних спостережень, а також мовою, за допомогою якої повідомляються отримані математичні результати.

Статистичні методи включають як прості методи, які доступні навіть непідготовленим користувачам, так і складні математичні процедури, доступні лише кваліфікованим фахівцям високого класу.

Методами статистичної обробки результатів експерименту називаються математичні прийоми, формули, способи кількісних розрахунків, за допомогою яких показники, що одержані в ході експерименту, можна узагальнювати, приводити в систему, виявляючи приховані в них закономірності.

Головна мета будь-якого статистичного методу - представити кількісні дані в систематизованій і стислій формі з тим, щоб полегшити їх розуміння.

Всі методи статистичного аналізу умовно діляться на первинні і вторинні.

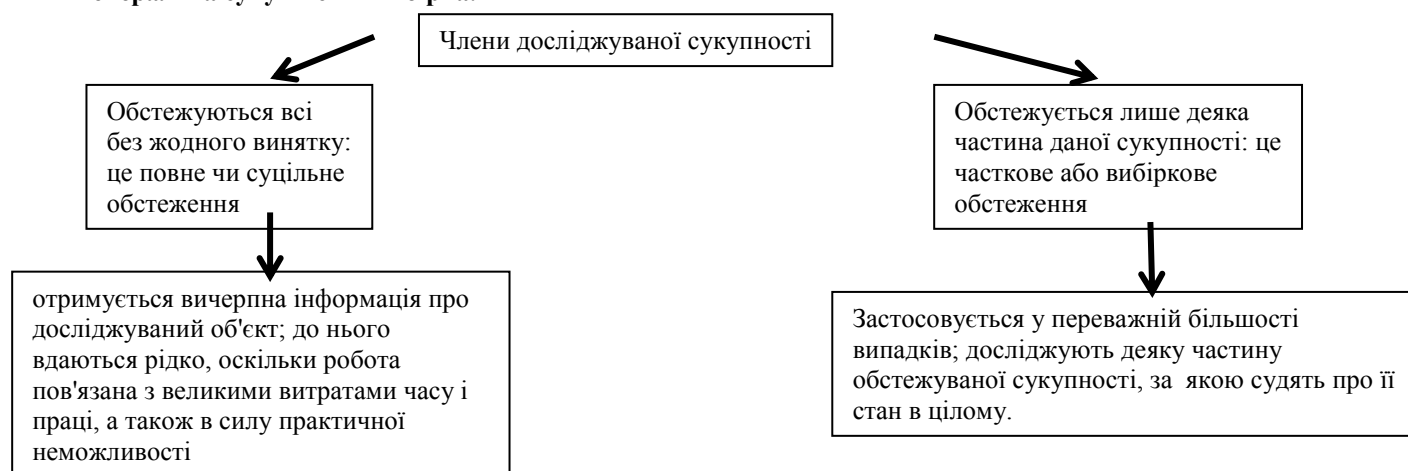
ПЕРВИННІ: методи, за допомогою яких можна отримати показники, що безпосередньо відображають результати отриманих в експерименті вимірювань. Це:

- визначення середньої арифметичної,
- дисперсії,
- моди
- медіани

ВТОРИННІ - методи статистичної обробки, за допомогою яких на базі первинних даних виявляють приховані в них статистичні закономірності. Це:

- кореляційний аналіз,
- регресійний аналіз,
- факторний аналіз,
- методи порівняння первинних даних двох або декількох вибірок.

Генеральна сукупність і вибірка.



Сукупність, з якої відбирають певну частину її членів для спільного вивчення, називають **генеральною**.

Відібрана тим чи іншим способом частина генеральної сукупності отримала назву **вибіркової сукупності** або **вибірки**.

Загальну суму членів генеральної сукупності називають її **обсягом** і позначають буквою **N**.

Обсяг генеральної сукупності нічим не обмежений, тобто генеральну сукупність представляють як нескінченно велику безліч відносно однорідних одиниць або членів, що складають її зміст. Обсяг вибірки, що позначається буквою **n**, може бути і великим, і малим, але він не може містити менше двох одиниць.

2. Описова статистика

Описова статистика дозволяє узагальнювати первинні результати, отримані при спостереженні або в експерименті.

Процедури тут зводяться:

- до угруповання даних по їх значенням,
- побудови розподілу їх частот,
- виявлення центральних тенденцій розподілу (наприклад, середньої арифметичної, моди, медіани)
- до оцінки розкиду даних по відношенню до знайденої центральної тенденції.

2.1 Частотний розподіл

Як правило, в результаті емпіричного дослідження буває досить багато вихідних первинних даних, які підлягають статистичній обробці. Наприклад, колонка з 1000 тестових показників.

Оскільки їх багато – можна скласти таблицю частотного розподілу:

Ряд первинних даних виписують у перший стовпчик таблиці в порядку убутання.

Коли показники розподілені по порядку, підраховують кількість випадків для кожного показника. Отримане таким способом число і є частота (кількість випадків) для відповідного показника. Сума всіх частот дорівнює загальному числу тестових показників (або обсягом вибірки n).

У другій стовпчик впишемо частоту зустрічаємості кожного первинного результату (див. табл. 1).

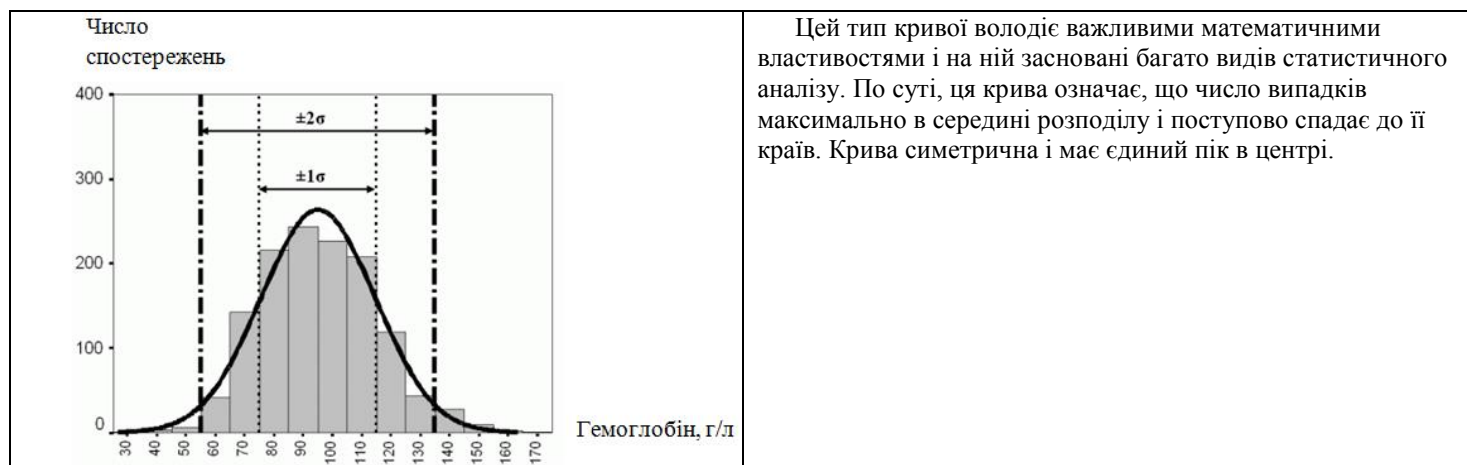
Таблиця 1 частотного розподілу даних по тесту		Інформація, що міститься в частотному розподілі, може бути також представлена графічно у вигляді кривої розподілу																											
<table><tr><th>Первинний результат</th><th>Частота</th></tr><tr><td>26</td><td>2</td></tr><tr><td>25</td><td>2</td></tr><tr><td>24</td><td>8</td></tr><tr><td>23</td><td>5</td></tr><tr><td>22</td><td>6</td></tr><tr><td>21</td><td>7</td></tr><tr><td>20</td><td>9</td></tr><tr><td>19</td><td>5</td></tr><tr><td>18</td><td>4</td></tr><tr><td>17</td><td>1</td></tr><tr><td>16</td><td>2</td></tr><tr><td>15</td><td>3</td></tr><tr><td>14</td><td>2</td></tr></table>	Первинний результат	Частота	26	2	25	2	24	8	23	5	22	6	21	7	20	9	19	5	18	4	17	1	16	2	15	3	14	2	<p>Крива полігону частот і гістограма</p>
Первинний результат	Частота																												
26	2																												
25	2																												
24	8																												
23	5																												
22	6																												
21	7																												
20	9																												
19	5																												
18	4																												
17	1																												
16	2																												
15	3																												
14	2																												

Для того, щоб зробити узагальнені дані про характер розподілення результатів по тесту і в разі, якщо отримано занадто велике число значень первинного результату, необхідно зробити угруповання даних і провести аналогічну процедуру побудови частотного розподілу. Згрупуємо дані, представлені в табл. 1, об'єднуючи їх по 3 одиниці в кожній групі (або з інтервалом 3 одиниці). Угрупування даних проводиться від мінімального значення до максимального. Для того, щоб інтервали значень були рівномірними, додамо ще два значення в нижній частині ряду (12 і 13), так як 26 балів є максимальним для даної методики. Частота цих первинних показників, що зустрічаються в нашій вибірці дорівнює 0. Частотний розподіл придбає такий вигляд:

Інтервал значень	Частота	Число випадків
24-26	12	<p>Показник</p>
21-23	18	
18-20	18	
15-17	6	
12-14	2	

Судячи з характеру розподілу, представленого на рис.2 воно не є нормальним і характеризується невеликою асиметрією зі зрушенням в бік високих значень.

Ідеальна нормальна крива зображена на даному рисунку



Більшість розподілів чисельних показників наближаються до нормальної кривої. Можна відзначити таку закономірність: чим більша група, тим ближче розподіл показників до нормальної кривої

2.2 Відсоткові показники

Відсоткові показники використовуються для того, щоб частотний розподіл за тією чи іншою змінною привести до основи 100 (аналогічно, пропорції використовуються для приведення даних до основи 1). У такому вигляді дані є кращими в інтуїтивному сенсі в порівнянні з «сирим» частотним розподілом.

Приклад (успішність здачі сесії):

Успішність	Частота	%	Пропорції
Були трійки	28	45,2	0,452
Без трійок, в основному на чотири	11	17,7	0,177
Без трійок, в основному на п'ять	13	21,0	0,210
На відмінно	10	16,1	0,161
Разом	62	100,0	1,000

2.3 Заходи центральної тенденції

Заходи центральної тенденції (мода, медіана і середнє арифметичне) дають інформацію про типові або центральні значення розподілу.

Мода говорить про значення, що найбільш часто зустрічається,

Медіана - про середнє значення,

Середнє арифметичне - про найбільш очікуване значення.

Найбільш часто використовують середнє арифметичне. Його обчислюють, розділивши суму всіх значень даних на число цих даних.

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

2.4 Міри розкиду даних

Для більш повного опису результатів емпіричного дослідження використовуються міри розкиду (або варіативності) даних, що характеризують ступінь індивідуальних відхилень від центральної тенденції. Найбільш наочним і відомим способом подання розкиду є розмах розподілу, тобто різницю між найвищим і найнижчим результатом. Але ця міра вкрай неточна і нестійка, тому що вона визначається тільки двома показниками, і єдиний надзвичайно високий або низький результат може помітно вплинути на величину розмаху. Більш точний метод вимірювання розкиду даних заснований на обліку різниці між кожним індивідуальним результатом і середньоарифметичним значенням по групі. Такий мірою розкиду

є **дисперсія або середній квадрат відхилення** (σ^2).

Дисперсія як статистична величина характеризує, наскільки приватні значення відхиляються від середньої величини в даній вибірці. Чим більша дисперсія, тим більше відхилення або розкид даних.

Дуже часто замість дисперсії для виявлення розкиду приватних даних щодо середньої використовують похідну від дисперсії величину - стандартне (або вибіркове) відхилення. Воно дорівнює квадратному кореню, який витягується з дисперсії, і позначається тим же знаком, тільки без квадрата (σ). Ця величина в ряді випадків виявляється більш зручною характеристикою варіювання, ніж дисперсія, так як виражається в тих же одиницях, що і середня арифметична величина.

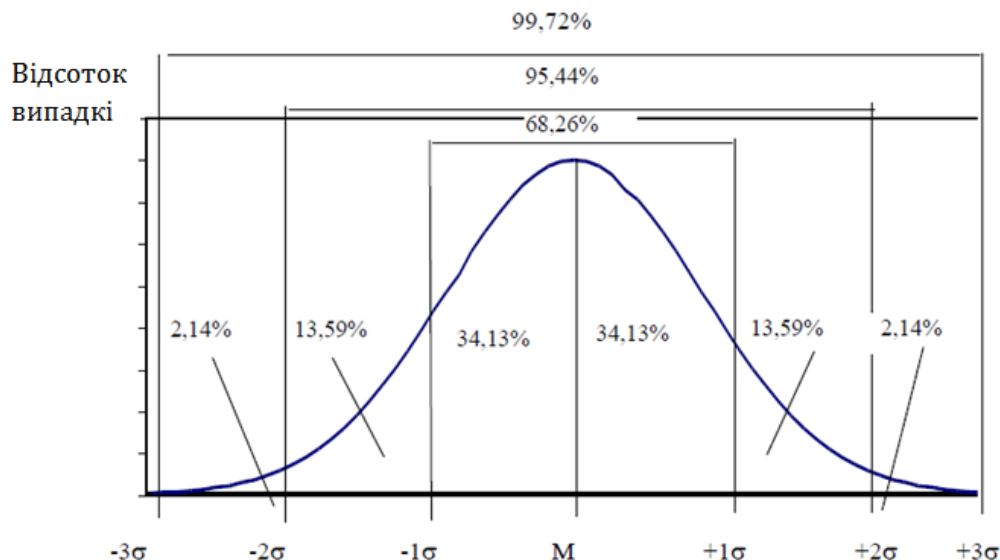
Визначають стандартне відхилення від середнього за формулою:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\Delta x_1^2 + \Delta x_2^2 + \dots + \Delta x_n^2}{n}}$$

Для того, щоб більш точно оцінити стандартне відхилення для малих вибірок (з числом елементів менше 30), в знаменнику виразу під коренем треба використовувати не n , а $n-1$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\Delta x_1^2 + \Delta x_2^2 + \dots + \Delta x_n^2}{n-1}}$$

Особливо чіткою виявляється інтерпретація σ стосовно нормальної або до приблизно нормальної кривої розподілу, тому що тут існує пряма відповідність між σ і відносною кількістю випадків. На рис. по горизонтальній осі відкладені інтервали, які відповідні відхиленню в 1σ , 2σ і 3σ вправо і вліво від середнього значення (M). Відсоток випадків, що припадають на інтервал $M+1\sigma$ в нормальному розподілі дорівнює 34,13. Оскільки крива симетрична, 34,13% випадків припадає також на інтервали від M до -1σ , так що діапазон від -1σ до $+1\sigma$ охоплює 68,26% випадків. Майже всі випадки (99,72%), тобто майже всі показники лежать від -3σ до $+3\sigma$ щодо середнього значення.



Більшість розподілів первинних результатів дослідження ближче до нормального розподілу, ніж до будь-якого іншого.

Властивості нормального розподілу

1. У нормальному розподілі всі міри центральної тенденції рівні між собою, тобто сходяться в одній точці на графіку ($M = Me = Mo$).
2. У нормальному розподілі приблизно 99% всіх значень досліджуваної змінної знаходиться в межі $M \pm 3\sigma$. Відсотковий розподіл випадків на кривій нормального розподілу називають "законом трьох сігм" (див. рисунок).
3. Крива нормального розподілу має вигляд дзвона, вона симетрична (асиметрія відсутня, $As = 0$) і не має надто гострої або занадто плоскої вершини (ексцес відсутній, $Ex = 0$).

Нормальний розподіл



Можна застосовувати стандартні вторинні методи: t -критерій та дисперсійний аналіз

Нормальний розподіл (або мала вибірка)



Необхідно застосовувати стандартні непараметричні критерії

3. Методи вторинної статистичної обробки результатів

За допомогою вторинних методів статистичної обробки даних безпосередньо перевіряються, доводяться або спростовуються гіпотези, пов'язані з емпіричним дослідженням.

Найчастіше в дослідженнях застосовують такі методи вторинної статистичної обробки результатів:

- 1) Методи порівняння двох або кількох елементарних статистик (середніх, дисперсій, тощо), що відносяться до різних вибірок;
- 2) Методи встановлення статистичних зв'язків між змінними (наприклад, їх кореляції між собою);
- 3) Методи виявлення внутрішньої статистичної структури емпіричних даних (наприклад, факторний аналіз).

1) Методи порівняння елементарних статистик

Жодне біологічне дослідження не обходиться без порівнянь.

Порівнюють:

- результати, отримані двома різними групами досліджуваних;
- результати, отримані однією вибіркою випробовуваних, але в різний час або в різних умовах.

Про відмінності між ними судять зазвичай за різницею між середніми, дисперсіями і іншими вибірковими показниками.

У статистиці широке застосування отримала так звана **нульова гіпотеза (H_0)**.

Суть її зводиться до припущення, що різниця між генеральними параметрами порівнюваних груп дорівнює нулю і що відмінності, які спостерігаються між вибірковими характеристиками носять не систематичний, а виключно випадковий характер.

Для перевірки цієї гіпотези використовують спеціальні критерії достовірності (**параметричні критерії**): t - критерій Стьюдента і F - критерій Фішера (за умови нормального розподілу досліджуваної змінної). Перший використовують для порівняльної оцінки середніх величин, другий - для порівняльної оцінки дисперсій.

Якщо розподіл не нормальний, то використовують **непараметричні критерії**.

ПАРАМЕТРИЧНІ СТАТИСТИЧНІ МЕТОДИ

t - критерій Стьюдента

Використовують для порівняння вибірових середніх величин, що належить до двох сукупностей даних, і для вирішення питання про те, чи відрізняються середні значення статистично достовірно одне від іншого.

Метод Стьюдента різний для незалежних і залежних вибірок. **Незалежні вибірки** отримують при дослідженні двох різних груп випробовуваних. Для аналізу різниці середніх застосовують формулу:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

Після того як за допомогою формули вираховано показник t, за спеціальною таблицею для заданого числа ступенів свободи, що дорівнює $(n_1 + n_2) - 2$ і обраної ймовірності припустимої помилки (таблицю), знаходять потрібне табличне значення t і порівнюють з ним розраховане значення t. Якщо обчислене значення t більше або дорівнює табличному, то роблять висновок про те, що порівнювані середні значення з двох вибірок дійсно статистично достовірно різняться з прийнятою ймовірністю допустимої помилки, тобто нульова гіпотеза не вірна.

До **залежних вибірок** відносяться, наприклад, результати однієї і тієї ж групи випробовуваних до і після впливу незалежної змінної.

Даний метод порівняння середніх величин застосовується тоді, коли необхідно, наприклад, встановити, вдався чи не вдався експеримент, надав або не чинив він вплив на рівень, наприклад, збільшення сполук чи клітин в організмі. Оцінюються залежні змінні на початку і в кінці експериментального дослідження.

Отримавши такі оцінки і обчисливши середнє по всій вивченій вибірці випробовуваних, ми можемо скористатися критерієм Стьюдента для точного встановлення наявності або відсутності статистично достовірних відмінностей між середніми до і після експерименту.

Якщо виявиться, що вони дійсно вірогідно розрізняються, то можна буде зробити певний висновок про те, що експеримент вдався. В іншому випадку немає переконливих підстав для такого висновку навіть в тому випадку, якщо самі середні величини на початку і в кінці експерименту за своїми абсолютними значеннями різні.

Для визначення достовірності різниці середніх у разі залежних вибірок застосовується наступна формула:

$$t = \frac{\sum d}{\sqrt{\frac{n \sum d^2 - (\sum d)^2}{n-1}}}$$

Дисперсійний аналіз (ANOVA)

На відміну від t-критерію **дисперсійний аналіз (ANOVA)** дозволяє порівнювати середні значення **трьох і більше груп**.

В основі дисперсійного аналізу лежить припущення про те, що одні змінні можуть розглядатися як причини (фактори, незалежні змінні), а інші як слідства (залежні змінні).

Основна мета: дослідження значущості відмінності між середніми за допомогою порівняння дисперсій. Поділ загальної дисперсії на кілька джерел, дозволяє порівняти дисперсію, викликану відмінностями між групами, з дисперсією, викликану внутрішньогруповою мінливістю.

Вибірки (3 і більше) можуть бути як рівними, так і нерівними за чисельністю, як пов'язаними, так і непов'язаними. За кількістю виявлених регульованих факторів дисперсійний аналіз може бути **однофакторний** (при цьому вивчається вплив одного фактора на результати експерименту), **двофакторний** (при вивченні впливу двох чинників) і **багатофакторним** (дозволяє оцінити не тільки вплив кожного з факторів окремо, але і їх взаємодію).

НЕПАРАМЕТРИЧНІ СТАТИСТИЧНІ МЕТОДИ

Непараметричні методи дозволяють обробляти дані "низької якості" з вибірок малого обсягу зі змінними, про розподіл яких мало що або взагалі нічого невідомо.

Непараметричні методи не ґрунтуються на оцінці параметрів (таких як середнє або стандартне відхилення) при описі вибіркового розподілу величини, що цікавить. Тому ці методи іноді також називаються вільними від параметрів або вільно розподіленими.

По суті, для кожного параметричного критерію є, принаймні, один непараметричний аналог. Ці критерії можна віднести до однієї з наступних груп:

- А) критерії відмінності між незалежними вибірками
- Б) критерії відмінності між залежними вибірками
- В) критерії залежності між змінними

А) критерії відмінності між незалежними вибірками

Непараметричними альтернативами параметричного критерію для двох незалежних груп є:

- 1) U критерій Манна-Уїтні

- 2) Критерій серій Вальда-Вольфовиця
- 3) Двовибірковий критерій Колмогорова-Смірнова

Кілька незалежних груп: якщо ви маєте кілька груп, то можете використовувати Дисперсійний аналіз (ANOVA).

Його непараметричними аналогами є:

- 1) Рангові дисперсійний аналіз Краскела-Уолліса
- 2) медіанний тест

Б) критерій відмінності між залежними вибірками

Дві залежні вибірки: критерій Вілкоксона і ін.

Якщо ви хочете порівняти дві змінні, що відносяться до однієї і тієї ж вибірки (наприклад, математичні успіхи студентів на початку і в кінці семестру), то зазвичай використовується t-критерій для залежних вибірок.

Альтернативними непараметричними тестами є:

- 1) Критерій Вілкоксона парних порівнянь
- 2) Критерій знаків

Кілька залежних вибірок

Якщо розглядається більше двох змінних, що відносяться до однієї і тієї ж вибірки, то зазвичай використовується Дисперсійний аналіз (ANOVA) з повторними вимірами.

Альтернативним непараметричним методом є:

- 1) ранговий дисперсійний аналіз Фрідмана
- 2) Q критерій Кохрена

2) Кореляційний аналіз

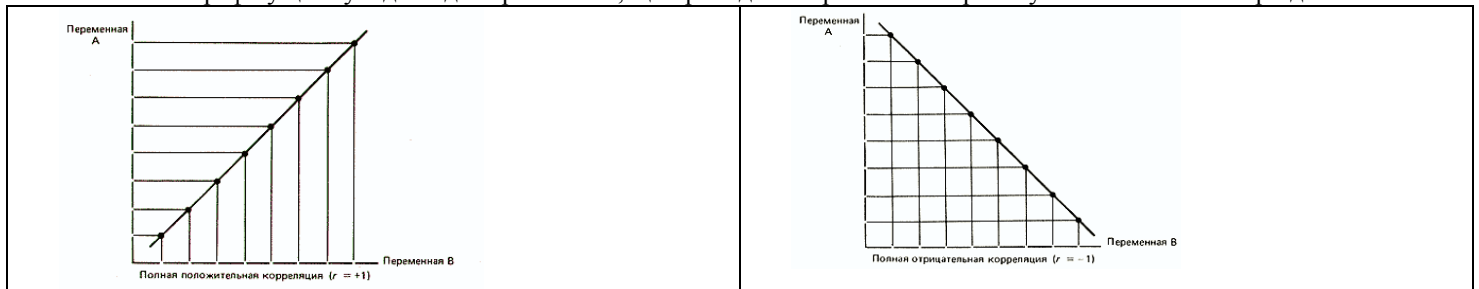
При вивченні кореляцій намагаються встановити, чи існує якийсь зв'язок між двома показниками в одній вибірці (наприклад, між зростанням і вагою дітей або між рівнем IQ і шкільною успішністю) або між двома різними вибірками (наприклад, при порівнянні пар близнюків), і якщо цей зв'язок існує, то чи супроводжується збільшення одного показника зростанням (позитивна кореляція) або зменшенням (негативна кореляція) іншого.

Можна використовувати два різні способи кореляційного аналізу: параметричний метод розрахунку коефіцієнта Брауна-Пірсона (r) і обчислення коефіцієнта кореляції рангів Спірмена (r_s), який є непараметричним.

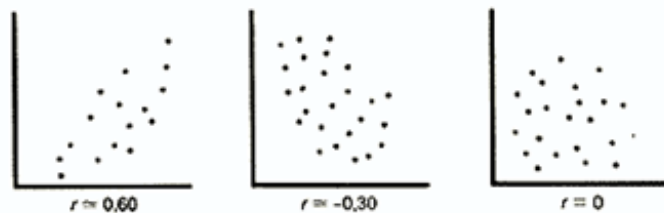
Коефіцієнт кореляції (позначається маленькою літерою r) і показує нам дві речі: 1) ступінь зв'язку двох змінних і 2) напрямок цього зв'язку (прямий або зворотний зв'язок).

Коефіцієнт кореляції - це величина, яка може варіювати в межах від +1 до -1. У разі повної позитивної кореляції цей коефіцієнт дорівнює плюс 1, а при повній негативній - мінус 1.

На графіку цьому відповідає пряма лінія, що проходить через точки перетину значень кожної пари даних:



У разі ж якщо ці точки не шикуються по прямій лінії, а утворюють «хмару», коефіцієнт кореляції за абсолютною величиною стає менше за одиницю і за мірою округлення цієї хмари наближається до нуля:



У разі якщо коефіцієнт кореляції дорівнює 0, обидві змінні повністю незалежні одна від одної.

При оцінці сили зв'язку коефіцієнтів кореляції використовується шкала Чеддока. При негативній кореляції значення сили зв'язку між змінними змінюють на протилежні. Таблиця аналізу сили зв'язку між змінними:

Значення	Інтерпретація
от 0 до 0,3	дуже слабкий
от 0,3 до 0,5	слабкий
от 0,5 до 0,7	середній

от 0,7 до 0,9	високий
от 0,9 до 1	дуже високий

Наприклад:

- якщо величина коефіцієнта кореляції між змінними дорівнює -0,36, то це слабка негативна кореляція, і швидше за все ми не будемо приймати її до уваги;
- якщо величина коефіцієнта кореляції дорівнює 0 - змінні не пов'язані між собою;
- якщо величина коефіцієнта кореляції між змінними дорівнює 0,25 то це дуже слабка кореляція і в більшості випадків ми не беремо її до уваги;
- якщо величина коефіцієнта кореляції між змінними дорівнює 0,75 то це висока кореляція і в своїх інтерпретаціях нам варто звернути на неї увагу;
- якщо величина коефіцієнта кореляції дорівнює 1 – змінні повністю взаємопов'язані.

Однак для того, щоб можна було робити висновки про зв'язки між змінними, велике значення має обсяг вибірки: чим вибірка більше, тим вірогідніше величина отриманого коефіцієнта кореляції. Існують таблиці з критичними значеннями коефіцієнта кореляції Браве-Пірсона та Спірмена для різного числа ступенів свободи.

Коефіцієнт кореляції Браве-Пірсона (r) – це параметричний показник, для обчислення якого порівнюють середні і стандартні відхилення результатів двох вимірювань. При цьому використовують формулу:

$r = \frac{(\sum XY) - n\bar{X}\bar{Y}}{(n - 1)s_x s_y},$	де $\sum XY$ - сума добутків даних з кожної пари; n-число пар; \bar{X} - середня для даних змінної X; \bar{Y} - середня для даних змінної Y; s_x - стандартне відхилення для розподілу x; s_y - стандартне відхилення для розподілу y
---	---

Коефіцієнт кореляції рангів Спірмена (r_s) - це непараметричний показник, за допомогою якого намагаються виявити зв'язок між рангами відповідних величин в двох рядах вимірів. Цей коефіцієнт розраховувати простіше, проте результати виходять менш точними, ніж при використанні r.

4. Роль і значення графічного методу в статистиці

Графіком в статистиці називається умовне зображення статистичних даних у вигляді різних геометричних образів: точок, ліній, фігур, тощо. Головна перевага графіків - наочність.

Графіки в статистиці, як правило, використовуються для широкої популяризації даних і полегшення їх сприйняття неспеціалістами, тому в доповідях, промовах і повідомленнях використання статистичних даних часто здійснюється за допомогою графіків. Графіки широко використовуються для узагальнення і аналізу статистичних даних.

Загальні правила побудови графічного зображення

При побудові графіка важливо знайти такі способи зображення, які найкращим чином відповідають змісту і логічній природі зображуваних показників.

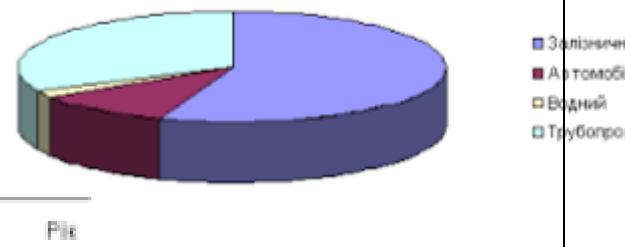
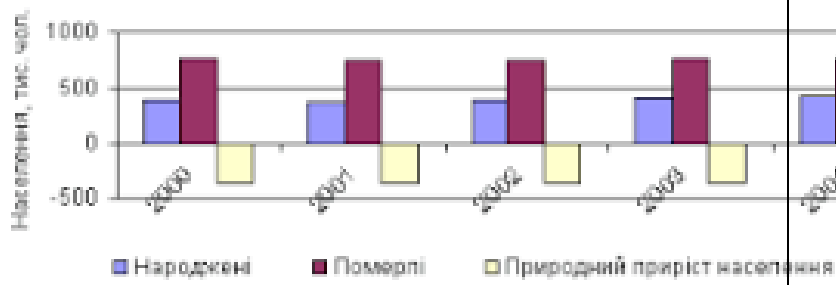
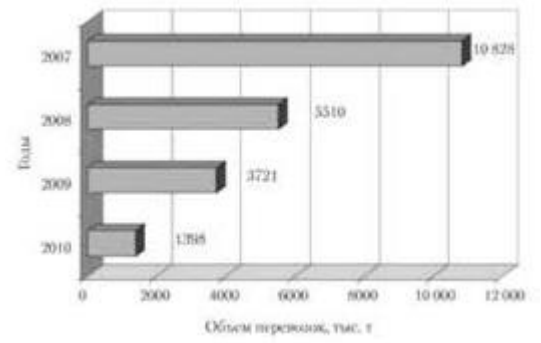
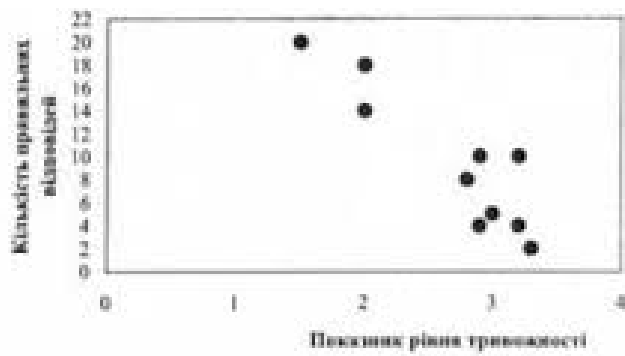
Кожен графік складається з **графічного образу і допоміжних елементів**.

Графічний образ (основа графіка) - це геометричні знаки, тобто сукупність точок, ліній, фігур, за допомогою яких зображуються статистичні показники. Важливо правильно вибрати графічний образ, який повинен відповідати меті графіка і сприяти найбільшій виразності зображуваних статистичних даних. Графічний образ може являти собою ряд стовпчиків або квадратів і т.п.

Допоміжні елементи уможливають читання графіка, його розуміння і використання. До них відносяться: заголовок графіка, підписи, пояснення.

За характером графічного образу розрізняють графіки об'ємні, лінійні і площинні





ЛЕКЦІЯ № 4

Тема: Склад крові. Гематологічні показники крові

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Кров - одна з трьох рідин, що входять до складу внутрішнього середовища організму. Це сполучна тканина, яскраво-червоного кольору, що безперервно циркулює по замкнутій системі кровоносних судин.

Кров - функціональна система, що забезпечує своєчасну доставку кисню і поживних речовин клітинам тканин і видалення продуктів метаболізму з органів і інтерстиціальних просторів. Кров і органи, в яких відбувається утворення клітин крові і їх руйнування (кістковий мозок, тимус, лімфатичні вузли, селезінка, печінка) об'єднуються в єдину систему крові.

У червоному кістковому мозку хребта і плоских кісток зосереджена основна маса кровотворних елементів, що беруть участь у вищих хребетних тварин в утворенні клітин крові.

Тимус (вилочкова залоза) є центральним органом імуногенезу; в ньому відбувається диференціювання Т-лімфоцитів, що беруть участь у клітинних реакціях імунітету.

Селезінка, лімфатичні вузли, як і тимус, відповідальні за вироблення імунітету. Наприклад, селезінка бере участь у синтезі імуноглобулінів, руйнуванні клітин крові, їх депонуванні.

У печінці синтезуються білки плазми і компоненти системи згортання крові, руйнуються еритроцити і утилізується гемоглобін, депонуються мінеральні елементи і антианемічні чинники.

Кров є рідкою сполучною тканиною, що складається з плазми і формених елементів. Загальна кількість крові у вищих тварин залежить від виду, статі, інтенсивності метаболізму - чим інтенсивніше протікає обмін, тим вище потреба в кисні і більше крові у тварини. В організмі людини 4,5-6,0 л крові, або 7% від маси тіла. Обсяг крові в організмі - величина досить постійна і ретельно регульована.

У спокої тільки 45-60% загального обсягу крові циркулює по судинному руслу (циркулююча кров), 55-40% вимкнено з кровообігу і зосереджено в кров'яних депо (депонована кров). Функцію депо крові виконують селезінка (депонує 16% від всієї маси крові), капілярна система печінки (20%), підшкірна жирова клітковина і капіляри шкіри (10%), легені (10%). При крововтратах, м'язовій роботі і функціях, які потребують напруги, депонована кров рефлекторно викидається в кров'яне русло, збільшуючи масу циркулюючої її частини.

Функції крові різноманітні:

- **Транспортна.** Кров переносить поживні речовини від органів травлення до тканин і клітин і продукти обміну до органів виділення. Беручи участь в дихальних процесах, кров переносить кисень від легенів до тканин і двоокис вуглецю від тканин до легеней. Переносячи гормони, інші біологічно активні речовини, електроліти та метаболіти, кров здійснює гуморальну регуляцію діяльності органів і систем організму.

- **Теплорозподільна і теплорегуляторная.** Циркулюючи в організмі, кров об'єднує органи, в яких утворюється тепло (печінка, скелетні м'язи) з органами, що його віддають (шкіра, легені), підтримуючи тим самим сталість температури тіла.

- **Захисна** (оберігає організм від дії мікроорганізмів і їх токсинів). Здійснюється за рахунок хімічних факторів (антитіл), фагоцитарної активності лейкоцитів і діяльності імунокомпетентних клітин, відповідальних за тканинний і клітинний імунітет.

- **Корелятивна.** Кров об'єднує всі системи організму, забезпечуючи його гуморальну єдність. Кров своєю сталістю складу і властивостями створює оптимальне середовище для життєдіяльності клітин і тканин.

Кров, як тканина включає формені елементи крові і міжклітинну речовину - **плазму**. Співвідношення між плазмою і форменими елементами - гематокритне число (гематокрит) відносно постійне. У людини об'єм плазми становить 55-60%, а клітин - 40-45% від загального

обсягу крові. Гематокрит дає уявлення про загальний обсяг еритроцитів і характеризує ступінь гемоконцентрації - гідремії, тобто вміст води в крові.

З плазми можна виділити **сироватку**. Сироватка майже тотожна плазмі за складом, але в ній відсутній фібриноген. Утворюється сироватка при згортанні крові поза організму після відділення від неї кров'яного згустку.

Фібриноген - це білок плазми, який в процесі коагуляції (згортання) перетворюється в фібрин, завдяки спільній дії протромбіну, речовини, що виробляється печінкою, і тромбопластину, що знаходиться в кров'яних пластинках - тромбоцитах. Таким чином, згусток є мережею фібрину, що уловлює еритроцити і діє як пробка, що закупорює рани.



Форменими елементами крові є:

ЕРИТРОЦИТИ - дрібні без'ядерні клітини двояковогнутої форми. Еритроцити утворюються в червоному кістковому мозку і переносять кисень до всіх клітин. Відкрито еритроцити Левенгуком у 1673 році. Кількість еритроцитів у крові дорослої людини становить 4,5-5 млн. в 1 кубічному мм. До складу еритроцитів входить вода (60%) і сухий залишок (40%). Середній вміст гемоглобіну в 100 г крові у здорових жінок становить 13,5 г, а у чоловіків - 15 г



Еритроцити виконують в організмі такі функції:

- 1) основною функцією є дихальна - перенесення кисню від альвеол легень до тканин і вуглекислого газу від тканин до легким;
- 2) регуляція рН крові завдяки одній з найпотужніших буферних систем крові - гемоглобінової
- 3) поживна - перенесення на своїй поверхні амінокислот від органів травлення до клітин організму;
- 4) захисна - адсорбція на своїй поверхні токсичних речовин;
- 5) участь у процесі згортання крові за рахунок вмісту факторів і антизсідальної систем крові;
- 6) еритроцити є носіями різноманітних ферментів (холінестерази, вугільна ангидраза, фосфатаза) і вітамінів (B1, B2, B6, аскорбінова кислота);
- 7) еритроцити несуть в собі групові ознаки крові.

Еритроцити складають більше 99% клітин крові. Вони складають 45% об'єму крові.

Еритроцити мають червоний колір через присутність білка - **гемоглобіну**, що складається з двох частин: білкової - глобіну і залізовмісної - гема. Саме гемоглобін зв'язує кисень і розносить його по всьому організму, забезпечуючи дихальну функцію і підтримання рН крові. Гемоглобін, що приєднав до себе кисень, перетворюється в яскраво червону речовину оксигемоглобін. Після вивільнення кисню виникає більш темна речовина - дезоксигемоглобін. У чоловіків в крові міститься в середньому 130 - 160 г / л гемоглобіну, у жінок - 120 - 150 г / л.

Про інтенсивність еритропоезу судять за кількістю ретикулоцитів - попередників еритроцитів. У нормі їх кількість становить 1 - 2%. Дозрілі еритроцити циркулюють в крові протягом 100 - 120 днів.

Руйнування еритроцитів відбувається в печінці, селезінці, в кістковому мозку за допомогою клітин мононуклеарної фагоцитарної системи. Продукти розпаду еритроцитів також є стимуляторами кровотворення.

Процес руйнування оболонки еритроцитів і вихід гемоглобіну в плазму крові називається **гемолізом**.



Причини гемолізу:

1. Природний. Цей процес проходить постійно в організмі, він починається при завершенні звичайного життєвого циклу кожного з еритроцитів, які живуть близько 100-130 днів.

2. Хімічний. Він виникає в тому випадку, якщо червоні кров'яні тільця піддаються впливу речовин, які можуть пошкодити ліпіди мембрани. До них відносять різні луги, спирти, ефіри, хлороформ. Наприклад, гемоліз буде яскраво вираженим, якщо людина отруїться значною дозою оцтової кислоти.

3. Біологічний. Оболонки еритроцитів починають руйнуватися через вплив гемолітичних отрут, наприклад, в результаті укусів комах або змій. Також біологічний гемоліз виникає через переливання несумісної крові

4. Температурний. При заморожуванні крові в еритроцитах утворюються кристали льоду. Після її розморожування вони розривають оболонку.

5. Механічний. При струшуванні ємності з кров'ю або при її перекачуванні апаратом, який штучно підтримує кровообіг, еритроцити пошкоджуються.

6. Осмотический. Якщо червоні тільця потраплять в середовище, де осмотичний тиск буде нижче, ніж в крові, то вони можуть лопнути. Це їх властивість використовують для діагностики анемії або захворювань печінки.

Якщо виділену з організму кров з рідиною, що оберігає від згортання, помістити в скляний капіляр, то еритроцити почнуть склеюватися і осідати на дно. Це прийнято називати **швидкістю осідання еритроцитів (ШОЕ)**. У нормі ШОЕ становить 4-11 мм. / год. (у здорових чоловіків становить 2 - 10 мм за годину, у жінок - 2 - 15 мм за годину) ШОЕ служить важливим діагностичним фактором в медицині.

ЛЕЙКОЦИТИ - безбарвні ядерні клітини крові людини. У спокої мають округлу форму, здатні активно пересуватися, можуть проникати крізь стінки судин. Основна функція - захисна, за допомогою псевдоподій поглинають і знищують різні мікроорганізми. Лейкоцити також були відкриті Левенгуком у 1673 році і класифіковані Р. Вірховим у 1946 році. Різні лейкоцити мають у складі цитоплазми гранули, або не мають, але на відміну від еритроцитів, мають ядро.

Кількість лейкоцитів в периферичній крові дорослої людини коливається в межах $4,0 - 9,0 \times 10^9$ / л, або 4000 - 9000 в 1 мкл. Збільшення кількості лейкоцитів у крові називається лейкоцитозом., зменшення - лейкопенією. У клініці має значення не тільки загальна кількість лейкоцитів, а й відсоткове співвідношення всіх видів лейкоцитів, що отримало назву

лейкоцитарної формули, або лейкограми. Лейкоцити діють в основному поза кровоносної системи, але в ділянки інфекції вони потрапляють саме з кров'ю.

Лейкоцити утворюються в різних органах тіла: в кістковому мозку, селезінці, тимусі, пахвових лімфатичних вузлах, мигдалинах і пластинках Пейє, в слизовій оболонці шлунка.

Лейкоцити поділяються на гранулоцити (не містять гранул) – базофіли, еозинофіли, нейтрофіли та агранулоцити (не містять гранули) – моноцити та лімфоцити. Їх також можна розділити за формулою ядра: полінуклеари та мононуклеари.

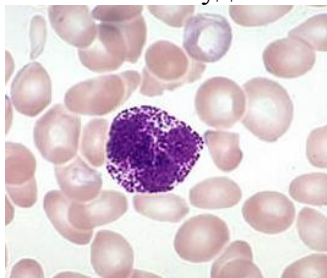
Гранулоцити.

Утворюються в червоному кістковому мозку. Мають розділене на лопасті ядро. Здатні до амебоїдного руху. Поділяються на: нейтрофіли, еозинофіли, базофіли.

Базофіли продукують і містять біологічно активні речовини (гепарин, гістамін і ін.).

Кількість у крові: 0-1 %

Особливості будови:

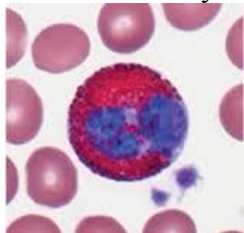


Гепарин перешкоджає згортанню крові в осередку запалення. Гістамін розширює капіляри, що сприяє розсмоктуванню і загоєнню. У базофілах містяться також гіалуронова кислота, що впливає на проникність судинної стінки; фактор активації тромбоцитів (ФАТ); тромбосани, що сприяють агрегації тромбоцитів; лейкотрієни і простагландини. При алергічних реакціях (кропив'янка, бронхіальна астма) під впливом комплексу антиген-антитіло відбувається дегрануляція базофілів і вихід у кров біологічно активних речовин, у тому числі гістаміну, що визначає клінічну картину захворювань.

Еозинофіли мають здатність до фагоцитозу, але це не має серйозного значення через їх невелику кількість в крові.

Кількість у крові: 0,5-5 %

Особливості будови:

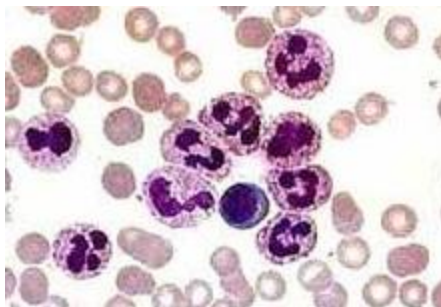


Основною функцією еозинофілів є знешкодження і руйнування токсинів білкового походження, чужорідних білків, а також комплексу антиген-антитіло. Еозинофіли продукують фермент *гістаміназу*, який руйнує гістамін, що звільняється з пошкоджених базофілів і тучних клітин при різних алергічних станах, глистових інвазіях, аутоімунних захворюваннях. Еозинофіли здійснюють протиглистовий імунітет, надаючи на личинку цитотоксичну дію. Тому при цих захворюваннях збільшується кількість еозинофілів в крові (еозинофілія). Еозинофіли продукують *плазміноген*, який є попередником плазміну - головного чинника фібринолітичної системи крові.

Нейтрофіли. Або фагоцити. На їх частку припадає близько 70% всіх лейкоцитів.

Кількість у крові: ПЯН – 1-6 %, СЯН – 47-72 %

Особливості будови:



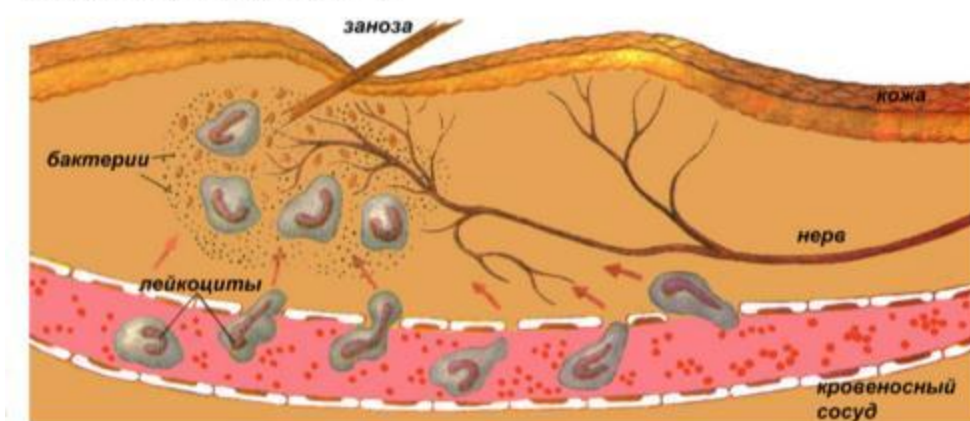
Вони проходять простір між клітинами, що утворюють стінки судин, і направляються до тих ділянок тіла, де виявляється вогнище зовнішньої інфекції. Нейтрофіли є активними поглиначами хвороботворних бактерій і продуктів розпаду тканин, яких переварюють всередині лізосом за допомогою лізосомних ферментів (протеази, пептидази, оксидази, дезоксирибонуклеази). Нейтрофіли першими приходять в осередок пошкодження. Так як вони є порівняно невеликими клітинами, то їх називають *мікрофагами*. Нейтрофіли мають цитотоксичну дію, а також продукують інтерферон, що володіє противірусною дією.

Розвиток нейтрофілів:



За нейтрофілами можна визначити стать людини, так як у жіночого генотипу є круглі вирости - "баранні палички".

Запальний процес при потраплянні у шкіру чужорідного тіла

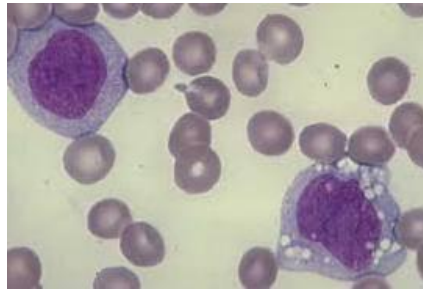
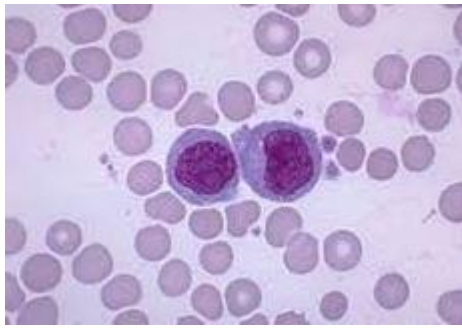


Агранулоцити:

Моноцити мають виражену фагоцитарної функцією.

Кількість у крові: 3-11 %

Особливості будови:



Це найбільші клітини периферичної крові і їх називають макрофагами. Моноцити знаходяться в крові 2-3 доби, потім вони виходять в навколишні тканини, де, досягнувши зрілості, перетворюються в тканинні макрофаги (гістіоцити). Моноцити здатні фагоцитувати мікроби в кислому середовищі, коли нейтрофіли не активні. Фагоцитуючи мікроби, загиблі лейкоцити, пошкоджені клітини тканин, моноцити очищають місце запалення і готують його для регенерації.

Моноцити синтезують окремі компоненти системи комплементу. Активовані моноцити і тканинні макрофаги продукують цитотоксини, інтерлейкін (ІЛ-1), фактор некрозу пухлин (ФНП), інтерферон, тим самим здійснюючи протипухлинний, противірусний, протимікробний і протипаразитарний імунітет; беруть участь в регуляції гемопоезу. Макрофаги беруть участь у формуванні специфічного імунної відповіді організму. Вони розпізнають антиген і переводять його в так звану імунотенну форму (презентація антигену). Моноцити продукують як чинники, які посилюють згортання крові (тромбоксани, тромбопластини), так і чинники, що стимулюють фібриноліз (активатори плазміногену).

Лімфоцити є центральною ланкою імунної системи організму.

Кількість у крові: 19-37 %

Особливості будови:

Вони здійснюють формування специфічного імунітету, синтез захисних антитіл, лізис чужорідних клітин, реакцію відторгнення трансплантата, забезпечують імунну пам'ять. Лімфоцити утворюються в кістковому мозку, а диференціювання проходять в тканинах. Лімфоцити, дозрівання яких відбувається у вилочковій залозі, називаються Т-лімфоцитами (тимусзалежні).

Розрізняють декілька форм Т-лімфоцитів:

Т-кілери (вбивці) здійснюють реакції клітинного імунітету, лізуючи чужорідні клітини, збудників інфекційних захворювань, пухлинні клітини, клітини-мутанти.

Т-хелпери (помічники), взаємодіючи з В-лімфоцитами, перетворюють їх в плазматичні клітини, тобто допомагають плин у гуморального імунітету.

Т-супресори (гнобителі) блокують надмірні реакції В-лімфоцитів.

Є також Т-хелпери і Т-супресори, що регулюють клітинний імунітет.

Т-клітини пам'яті зберігають інформацію про раніше діючі антигени.

В-лімфоцити (бурсозалежні) проходять диференціювання у людини в лімфоїдній тканині кишечника, піднебінних і глоткових мигдалин. В-лімфоцити здійснюють реакції гуморального імунітету. Більшість В-лімфоцитів є антитілопродуцентами. В-лімфоцити у відповідь на дію антигенів у результаті складних взаємодій з Т-лімфоцитами і моноцитами перетворюються в плазматичні клітини. Плазматичні клітини виробляють антитіла, які розпізнають і специфічно пов'язують відповідні антигени. Розрізняють 5 основних класів антитіл, або імуноглобулінів: JgA, Jg G, Jg M, JgD, JgE. Серед В-лімфоцитів також виділяють клітини-кілери, хелпери, супресори і клітини імунологічної пам'яті.

О-лімфоцити (нульові) не проходять диференціювання і є як би резервом Т- і В-лімфоцитів.

ТРОМБОЦИТИ

Найдрібніші клітини крові. Їх іноді називають кров'яними пластинками. Це без'ядерні, плоскі клітини неправильної округлої форми діаметром 2 - 5 мкм.

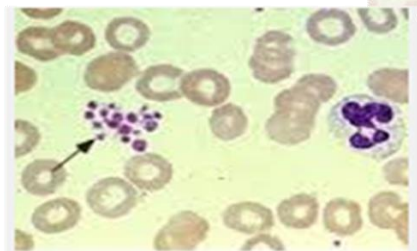
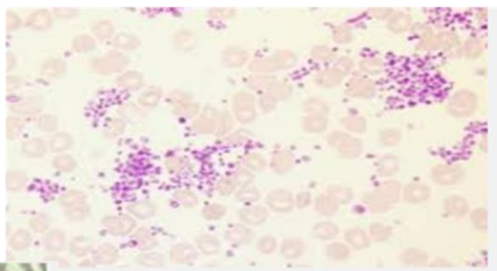
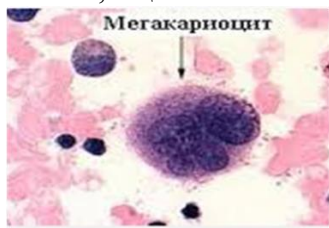
Головною функцією тромбоцитів є участь в гемостазі. Вони допомагають "ремонтувати" кровоносні судини, прикріплюючись до пошкоджених стінок, а також беруть участь в згортанні крові, яке запобігає кровотечі і виходу крові із кровоносної судини.

У 1 мм³ крові дорослої людини міститься 180-320 тис. тромбоцитів. Збільшення вмісту тромбоцитів в периферичній крові називається тромбоцитозом, зменшення - тромбоцитопенією.

Тромбоцити продукують і виділяють ряд біологічно активних речовин: серотонін (речовина, що викликає звуження кровоносних судин зменшення кровотоку), адреналін, норадреналін, а також речовини, що отримали назву пластинчастих чинників згортання крові. Так у тромбоцитів є різні білки, що сприяють коагуляції крові. Коли лопається кровоносна судина, тромбоцити прикріплюються до її стінок і частково закривають пролом, виділяючи так званий тромбоцитарний фактор III, який починає процес згортання крові шляхом перетворення фібриногену в фібрин. Тромбоцити здатні виділяти з клітинних мембран арахідонову кислоту і перетворювати її в тромбосани, які, в свою чергу, підвищують агрегаційну активність тромбоцитів. Ці реакції відбуваються під впливом ферменту циклооксигенази.

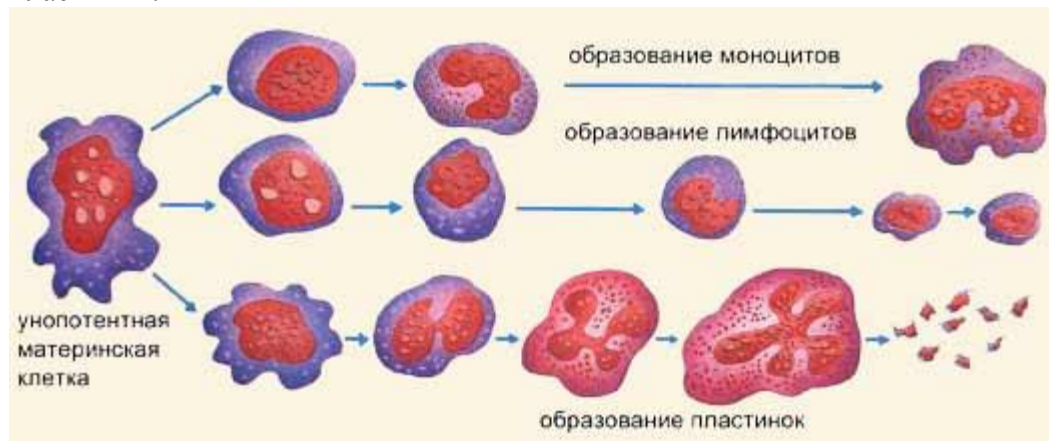
Тромбоцити здатні до пересування за рахунок утворення псевдоподій і фагоцитозу сторонніх тіл, вірусів, імунних комплексів, тим самим, виконуючи захисну функцію. Тромбоцити містять велику кількість серотоніну і гістаміну, які впливають на величину просвіту і проникність капілярів, визначаючи тим самим стан гістогематичних бар'єрів.

По суті своїй клітинами не є. Являють собою уламки великих клітин, що містяться в червоному кістковому мозку клітин - мегакаріоцитів. Вони зазнають неповний поділ, тому що ядро ділиться, а цитоплазма ні.



тромбоцити

В результаті утворюється мегакаріобласти, від цитоплазми яких в кінці відокремлюються пластинки.



Тривалість життя тромбоцитів становить від 5 до 11 днів. Руйнуються кров'яні пластинки в клітинах системи макрофагів.

Лекція № 7

Тема: Правила проведення робіт з використанням лабораторних тварин

План:

1. Використання тварин в експериментах
2. Критерії відбору лабораторних тварин для медико-біологічного моделювання.
3. Відбір і підготовка тварин до експерименту
4. Порядок проведення процедур на тваринах
5. Дозування лікарських засобів для експериментальних тварин.
6. Поняття про дозу та ефект. Види доз.
7. Фактори, що впливають на чутливість тварин до фармакологічних речовин.

1. Використання тварин в експериментах

Тварини інбредних ліній є ефективним інструментом для медичних і біологічних досліджень. Відбір тієї чи іншої лінії ґрунтується на інформації про генетичні і біологічні особливості кожної лінії, а також визначається метою і характером самого дослідження.

Медико-біологічні експерименти з використанням тварин можна розділити на наступні основні групи:

1. Експерименти, в яких лабораторні тварини слугують інструментом вимірювання будь-яких речовин, препаратів і т.д. (вакцин, сироваток і гормональних препаратів). Для подібних дослідів генотип неістотний, тому для «біопроб» можна використовувати гібриди лінійних тварин і навіть нелінійних.
2. Моделювання патологічних станів (онкологічні дослідження, вивчення процесів запалення, імунітету). Для цих експериментів істотно, наскільки велика роль генетичних факторів у розвитку досліджуваного стану. Якщо роль досить велика (як, наприклад, у виникненні злоякісних пухлин), то їх можна проводити тільки на певних лініях. Якщо вони безпосередньо залежать від генетичних факторів - різні людські хвороби, то для їх вивчення придатні тільки аналогічні мутантні форми мишей.
3. Дослідження впливу різних речовин і факторів зовнішнього середовища, коли вивчається реакція живою організму на ці дії і в кінці дослідження можлива постановка питання про екстраполяцію на людську популяцію. Для подібних досліджень обмежитися вибором однієї лінії або гібридної комбінації можна тільки в тому випадку, коли роль генетичних факторів у досліджуваному процесі дуже мала. Іноді вибір ліній полегшується тим, що по досліджуваному питанню є інформація, що входить в характеристику лінії.

2. Критерії відбору лабораторних тварин для медико-біологічного моделювання

2.1 Видовий критерій. Вибір представників певного виду лабораторних тварин диктується перш за все морфо функціональними особливостями, які дають у максимально короткий строк і з граничною точністю побудувати модель біологічного процесу, захворювання тощо. Історія використання лабораторних тварин привела до того, що майже для кожного напрямку медико-біологічних досліджень підбір виду став традиційним. Проте є тенденція до розширення застосування зоооб'єктів. Як правило, залучання нових видів у якості лабораторних об'єктів обґрунтовано можливістю отримати модель, більш адекватну явищу, що вивчається, ніж система з традиційними тваринами.

Наприклад: Є спроба моделювання захворювання лепри на броненосці. На відміну від інших лабораторних тварин у броненосця низька температура тіла та шкіри і більша тривалість життя, що створює більш сприятливі умови для розвитку збудника та вивчення прогресуючих форм захворювання.

2.2 Віковий критерій. В процесі індивідуального зростання в різних екологічних умовах тварини відчувають вплив багатьох факторів, які приводять до того, що в одному і тому ж віці їх вага варіює у широких межах. До цих факторів належать генотип і стать, кліматичні умови, мікроклімат у приміщеннях, частота переробки і сортування тварин протягом доби, неоднорідність і якість харчування.

Наприклад: вага щурів у 2-місячному віці, які отримували гранульовані корма, була у самиць у середньому 137 г, у самців – 179 г, тоді як молодняк того ж віку на звичайній дієті із зерноsumіші важив

відповідно 86 та 91 г. Таким чином одна й та ж вага тварин може не відповідати їх віку з відхиленням на 30 діб. Для таких швидкозростаючих видів, як лабораторні гризуни, ця різниця дуже суттєва. Тому треба краще враховувати вік тварин. Вага є лише частковою та достатньо змінною ознакою, проте повинна враховуватися тоді коли це необхідно за умовами експерименту.

2.3 *Критерій генотипу:*

2.4 *Мікробіологічний статус*

3. Вибір і підготовка тварин до експерименту

Для проведення експериментів слід відбирати здорових тварин однієї статі і віку з однаковою масою тіла. Відступ від цього правила можливий у випадку, якщо використання різностатевих, різновікових тварин чи тварин, що різняться за іншими ознаками входить у завдання експерименту. Для зменшення статистичного розкиду експериментальних даних бажано використовувати тварин чистих ліній, вільних від патогенної мікрофлори. Вид тварини повинен бути адекватний цілям експерименту. Кількість тварин має бути мінімальною, але достатньою для отримання достовірних результатів.

У період підготовки до експерименту і після його закінчення тварини повинні утримуватися в стандартних умовах віварію і отримувати харчування відповідно до встановлених норм.

Транспортування експериментальних тварин повинно здійснюватися з використанням спеціальних контейнерів і дотриманням нормальних умов існування і годування тварин.

Якщо тварини погано переносять умови тривалого транспортування слід визначити проміжні пункти транспортування, на яких тварини могли б відпочити і адаптуватися до нових кліматичних або інших умов навколишнього середовища. Після завершення транспортування тваринам необхідний період адаптації.

4. Порядок проведення процедур на тварин.

Всі процедури на тваринах проводяться суворо відповідно до вимог, викладених в «Правилах проведення робіт з використанням експериментальних тварин за № 755 від 12.08.1977»).

Премедикація тварин проводиться відповідальним виконавцем експерименту або під його наглядом. Якщо тварина злякана або наркоз ще не подіяв, необхідно почекати, поки тварина заспокоїться або засне.

Фіксувати тварину слід тільки після того, як подіє наркоз.

При іммобілізації бадьорих тварин дозволяється прив'язувати їх до дошки тільки на нетривалий час. Пов'язки на кінцівках прив'язаної тварини повинні бути м'якими і не порушувати кровообіг.

Експериментальні втручання, в тому числі і хірургічні операції, слід виконувати із застосуванням седативних, анагетичних та наркологічних препаратів відповідно до норм, прийнятих у ветеринарній практиці. Не можна проводити хірургічні операції і інші хворобливі процедури на знерухомлених за допомогою міорелаксантів тваринах, які не отримали наркозу. Після подачі тварині наркозу необхідний постійний контроль за його рівнем і при перших ознаках ослаблення наркозу він повинен бути поглиблений. (Доза і час введення наркотичних речовин фіксується в журналі експерименту).

При проведенні експериментів і процедур з підвищеним ризиком нанесення тварині хворобливих подразнень обов'язкова присутність ветеринара чи відповідального виконавця і контроль з їхнього боку за адекватним знеболенням.

Тварини можуть зазнавати тільки однієї серйозної операції, якщо повторне оперативне втручання не передбачено переконливо обґрунтованими завданнями експерименту. Повторне використання тварин допускається тільки в особливих випадках з дозволу Комісії з біоетики.

Умови утримання та харчування тварин під час експерименту визначаються цілями останнього, але не повинні завдавати тварині біль і страждання.

Великі експериментальні тварини повинні мати індивідуальну експериментальну карту, в якій відбиваються всі маніпуляції по ходу експерименту аж до його завершення. Карта зберігається протягом 1 року після опублікування статті або подання звіту. У разі не передбаченої експериментом загибелі тварини воно підлягає патологоанатомічному розтину в присутності відповідального виконавця, ветеринара і незалежного експерта.

післяопераційному періоді тварина повинна отримувати кваліфікований догляд і ветеринарну допомогу. Тварина, що опинилося після експерименту нежиттєздатною або зазнає фізичні страждання,

що не піддаються усуненню, повинна бути своєчасно піддана евтаназії.

5. Дозування лікарських засобів для експериментальних тварин.

ДОЗА,-и, ж. точно відведені кількість чого-небудь (якогось речовини, ліки).

В рецепті дози вказують в грамах, мілілітрах або біологічних одиницях дії (ОД). Доза, що призначається на один прийом, називається разову, протягом доби - добовою. В ряді випадків встановлюються доза на весь курс лікування (курсів дози). Мінімальна доза, в якій лікарський засіб надає лікувальну дію, позначається як мінімальна терапевтична доза, а найбільша допустима доза - як вища терапевтична доза. Розрізняють вищі разові і вищі добові дози. У практиці найчастіше використовують середні терапевтичні дози. При перевищенні терапевтичних доз лікарські препарати надають токсичну дію, у зв'язку з чим виділяють також мінімальні, середні токсичні і смертельні дози. Діапазон між мінімальною терапевтичною та мінімальною токсичною дозами приймають за широту терапевтичної дії. Оскільки в лікувальній практиці мінімальні терапевтичні дози використовують дуже рідко, про широту терапевтичної дії лікарських засобів зазвичай судять за інтервалом між його середньою терапевтичною і мінімальною токсичною дозами. Велика широта терапевтичної дії розцінюється як позитивна властивість лікарського засобу, оскільки дозволяє у великих межах варіювати індивідуальні дози.

При збільшенні фармакологічної дози, дія речовин зазвичай посилюється. Залежність між дозою і фармакологічним ефектом для різних речовин може носити різний характер. Існують лінійна залежність між дозою та ефектом (ефект збільшується відповідно збільшенню дози), гіперболічна залежність (при збільшенні дози ефект наростає спочатку швидко, а потім повільно) і S-подібна залежність (при збільшенні дози ефект ліків наростає спочатку повільно, а потім швидко, після чого знову сповільнюється).

Величина застосовуваних доз може залежати від характеру патології, при якій застосовують лікарський засіб, а також від особливостей організму. При хіміотерапії інф. хвороб нерідко на початку лікування призначають високу (ударну) дозу хіміотерапевтичного препарату. При лікуванні ряду хронічних захворювань іноді спочатку призначають ліки більш часто і в більш високих дозах, для того щоб створити необхідний рівень лікарської речовини в організмі (насичуючі дози), а потім переходять на невеликі (підтримуючі) дози.

Дітям лікарські засоби призначають в менших дозах, ніж дорослим. Для дітей певного вікового періоду (до 6 міс., від 6 міс. до 1 року, на 2 роки, в 3-4 роки, в 5-6 років, в 7-9 років і 10-14 років) і для дорослих у Державній фармакопеї наводяться вищі разові та добові дози отруйних і сильнодіючих лікарських засобів. Ці дози не можна перевищувати без відповідних показань.

При призначенні лікарських засобів людям старше 60 років дози багатьох препаратів, що пригнічують ц. н. с., серцевих глікозидів і сечогінних засобів зменшують до 1/2, а дози інших отруйних і сильнодіючих речовин - до 2/3 від доз, встановлених для осіб середнього віку.

7. Фактори, що впливають на чутливість тварин до фармакологічних речовин.

а. Вплив статі.

Статеві різниці у чутливості пов'язані зі специфікою будови, хімічного складу та напруги функціонування окремих систем організму, різної активності ензимів, особистістю метаболізму і структури гормональної регуляції обмінних процесів та іншими особливостями.

Наприклад: Статевозрілі самиці щурів значно більш стійкі до морфіну, солям свинцю, етиловому спирту. Самці більш резистентні до гексеналу, тіопенталу, нікотину, стрихніну.

б. Вплив віку. Ця проблема є змістом «вікової» фармакології, що систематизує знання про особливості реакції на фармакологічні речовини у післянатальному періоді до настання зрілості та у похилому віці. Велика варіабельність чутливості до фармакологічних речовин в залежності від віку підкреслює важливість експериментування на однорічних за віком групах тварин.

Наприклад: порогова доза норадреналіну при внутрішньовенному введенні старим кроликам складає 34 ± 3 нг/кг, молодим тваринам – 183 ± 23 нг/кг. У молодих мишей менша чутливість до

адреналіну

с. Вплив генетичних факторів. Бажане використання певних ліній тварин, найбільш чутливих до досліджуємого класу сполук. Наприклад: у мишей лінії A/LN середня тривалість сну, що викликається гексабарбіталом (125 мг/кг), майже у три рази перевищує таку у мишей лінії SWR/HeN (48 ± 4 хвилини та 14 ± 4 хв. відповідно).

d. Вплив біоритму на ефект лікарських речовин. Суттєвий вплив на чутливість до лікарських речовин мають сезонні та добові (циркадні) коливання активності внутрішнього середовища організму. Для об'єктивного співставлення активності фармакологічних речовин важливе проведення досліджень в один й той же сезонний період. Ця обставина особливо суттєва при порівнянні даних, отриманих на різних групах тварин.

Добові біоритми також впливають на чутливість тварин до фармакологічних речовин. Відомі добові коливання мітотичної активності клітин печінки мишей, вмісту глікогену у печінці, рН внутрішнього середовища організму, артеріального тиску, гемоглобіну тощо (до 40 фізіологічних параметрів). Це вказує на можливість суттєвих зрушень й в реактивності на фармакологічні агенти.

е. Фактори зовнішнього середовища й реактивність до фармакологічних речовин. З постійно впливаючих факторів зовнішнього середовища найбільш помітний вплив на чутливість організму до фармакологічних засобів надають температура та рівень барометричного тиску.

Наприклад: при підвищенні температури навколишнього повітря токсичність строфантину різко зростає.

У зв'язку з освоєнням континентального шельфу та широкою програмою океанографічних досліджень, розвитком авіаційної та космічної медицини, застосуванням у клінічній практиці барокамер виникає питання впливу змін барометричного тиску на реактивність організмів до фармакологічних речовин.

Лінії лабораторних тварин для медико-біологічних досліджень, їх утримання та розведення

ПЛАН:

1. Історія створення інбредних ліній тварин
2. Конгенні і мутантні лінії й стоки мишей
3. Структура віварію.
4. Правила утримання дослідних тварин у віварію.
5. Прибирання і дезінфекція віварію.
6. Правила особистої гігієни працівників віварію.
7. Правила годування лабораторних тварин.

1. Історія створення інбредних ліній тварин

Перші інбредні лінії виведені в США.

У межах інбредної лінії гомозиготні особини генетично однорідні, подібно однойцевим близнюкам. При відсутності гальмівних чинників 100%-ва гомозиготність досягається після проведення братсько-сестринського схрещування в перебігу 20 поколінь.

До початку 30-х р.р. в біології та медицині в експерименті використовувалися виключно білі лабораторні миші *Mus musculus*. Їх називали «безпорідними або нелінійними», а по закордонній термінології аутбредними мишами.

Формування генетики як науки на початку 20 століття показало непридатність безпорідних мишей для ряду досліджень, і сприяло створенню інбредної лінії тварин як нової моделі в біологічному експерименті.

Перші лінії мишей призначалися для дослідження канцерогенезу. Вони походили від невеликої кількості стоків колоній лабораторних мишей Північної Америки і Європи, білих мишей Багга, колонії мишей Ласроп.

Першим цю роботу в 1907 році розпочав Літтл, який вивчав успадкування забарвлення шерсті. У 1909 голу він отримав пару мишей з послаблено-коричневим забарвленням шерсті, що несли рецесивні гени *aa*, *bb*, *dd* і які лягли в основу назви лінії **dba**.

Протягом наступних 5 років більш ніж 20 поколінь цих мишей Літтл розводив братсько-сестринським схрещуванням із селекцією на виживаємість і наявністю пухлин молочних залоз. Таким чином, була отримана перша високоракова інбредна лінія мишей, яка з 1950 року позначалася як **DBA**.

Пізніше центром цієї роботи стала заснована Літлом Джексоновська лабораторія.

До теперішнього часу створено велику кількість нових інбредних ліній мишей.

Так, міжнародний список стандартної номенклатури інбредних ліній мишей, виданий у 1976 році, включав 252 лінії і сублінії.

Джерела виведення нових інбредних ліній мишей:

1) Спонтанні мутації, що виникли в тій чи іншій інбредній лінії або колонії нелінійних тварин.

Наприклад, інбредних лінія 129 / Re- + *dy* несе мутантний ген *dystrophia muscularis* (*dy*) (м'язова дистрофія), HRS - ген *hairless* (*hr*) (без шерсті).

2) В результаті селекції серед нелінійних або гібридних мишей на певну ознаку з подальшим братсько-сестринським інбридингом.

Наприклад, на базі аутбредних стоків були отримані дуже цінні інбредні лінії зі спонтанною аутоімунною хворобою: *NZB* і *NZW*.

Історично першим центром, звідки інбредні лінії лабораторних тварин передавалися в інші лабораторії світу, стала Джексоновська лабораторія (США). В даний час це найбільша теоретична і методологічна лабораторія із генетичної роботи з мишами, центр із підтримки і продажу не тільки інбредних, але й конгенно-резистентних ліній і мутантних стоків. Більшість інбредних і мутантних ліній на території України отримані в Джексоновській лабораторії.

Роботу з лабораторними тваринами в міжнародних масштабах очолює Міжнародний комітет з лабораторним тваринам (ICCA), створений за ініціативою ЮНЕСКО в 1956 році (ICLA) та який об'єднує державні центри по лабораторним тваринам у всьому світі.

2. Конгенні і мутантні лінії й стоки мишей

Лінії, генетично ідентичні, та які виключають відмінності за одним локусом, називаються **коізогенними**. Але практично дійсна коізогенність можлива тільки у разі одиначної мутації в інбредній лінії. Тому лінії, що близькі до цього стану, отримані спеціальними конгенними методами.

Більшість існуючих **конгенних** ліній мишей отримані американським ученим Снеллом для вивчення генів гістосумісності (надають найбільш сильний вплив на результати трансплантації тканин).

Наближення до ізогенного стану може бути досягнуте шляхом **уведення гена однієї лінії на генетичну основу іншої** за допомогою послідовних зворотних схрещувань.

Крос починається з двох ліній, **одна** з яких дає генетичну основу для **конгенної лінії** і повинна бути ізогенною, тобто *однорідною* за всіма генами. Цю лінію називають **інбредним партнером**. Інша лінія дає локус, за яким конгенні лінії будуть відрізнятися, тому її називають **донорською лінією**.

Запроваджуваний локус зчеплений із сегментом хромосоми, будучи її частиною. У цьому сегменті можуть бути присутніми інші гени як "домішки". Довжина цієї "чужорідної" хромосоми і число домішкових генів будуть зменшуватися зі збільшенням числа зворотних схрещувань з інбредною лінією. Лінія, виведена таким шляхом, яка наближається до коізогенного стану, але не може досягти його повністю, називається **конгенною**. Конгенна лінія і її інбредний партнер мають назву **конгенна пара**.

До теперішнього часу у лабораторних мишей відомо більше 800 **генних мутацій** і велика кількість **хромосомних**.

Часто мутантів знаходять серед гібридів або неінбредних тварин, тому деякий час їх розводять на основі неінбредних або частково інбредних стоків.

Існує **три напрямки використання** наявних в даний час колекцій **мутантів**:

- 1) Дослідження мутантних генів, як генетичних маркерів для локалізації нових мутацій і побудови хромосомних карт;
- 2) використання мутантів в якості природних моделей патологічних станів людини завдяки наявності ряду генів, що обумовлюють порушення розвитку, аналогічні вродженим хворобам людини;
- 3) застосування хромосомних перебудов як клітинних маркерів або як інструмента дослідження функціонування хромосом в онтогенезі.

3. Структура віварію

В структуру віварію входять:

- 1) кімната для обслуговуючого персоналу з індивідуальними шафами для спецодягу.
- 2) відділення для карантину та адаптації тварин, які тільки поступили з розплідника.
- 3) ізолятори для підозрілих на інфекційні захворювання та завідомо хворих тварин, знищення яких небажано за умовами досліду.
- 4) приміщення для утримання здорових тварин.
- 5) експериментальна кімната, обладнання та оснащення якої визначається у кожному конкретному випадку задачами та умовами наукових досліджень, які проводяться.
- 6) ізольовані приміщення для тварин, що вакциновані або інфіковані різними видами збудників.

Також у віварію повинні бути:

- 1) кормокухня - з двох суміжних приміщень для переробки та виготовлення кормів із самостійними виходами у коридор із кожного приміщення, комора із спеціально обладнаними ларями та холодильниками для збереження запасу кормів.
- 2) дезінфекційно-мийне відділення з двох кімнат, що об'єднані перехідним автоклавом або сухожаровою камерою. Інфікований матеріал, наприклад клітини, підстилка, годівниця, спочатку дезінфікують, а потім механічно чистять та миють. Матеріал, що не представляє небезпеки для зараження, спочатку підлягає механічному очищенню, а потім (при необхідності) стерилізації. Мийне приміщення має смітєпровід.
- 3) склад чистого інвентарю з клітками, поїлками, годівницями;
- 4) Побутові приміщення і санітарний блок для обслуговуючого персоналу.
- 5) Віварій розміщується в окремо розташованому будинку або на верхньому поверсі лабораторного корпусу. У цьому випадку він повинен бути повністю ізольованим від усіх інших приміщень.
- 6) Карантинне відділення, відділення для піддослідних та ізолятор для інфікованих тварин розміщуються в приміщеннях, які суворо ізольовані одне від одного та від усіх інших приміщень віварію

- 7) Приміщення для тварин повинно бути теплим, світлим і сухим, з природним та штучним освітленням, вентиляцією, підводкою гарячої та холодної води.
- 8) Підлога із водонепроникного матеріалу без плінтусів. Стіни покривають глазурованою плиткою, стелю та двері фарбують масляною фарбою.

4. Правила утримання дослідних тварин у віварію

Мишей, щурів, морських свинок і кролів утримують у клітинах, встановлених на металевих стелажах. Гризуни утримуються в клітках зі суцільним дном на підстилці або із сітчастим дном-підлогою. В якості підстилки використовуються деревинна тирса, стружка, волокнистий торф, м'яка солома. Підстилки заздалегідь автоклавують або дезінфікують у сухо жаровій шафі при температурі 150-180° С протягом 15-20 хв.

Норми площі для утримання лабораторних тварин

Вид тварин	Мінімальна площа дна клітки на одну тварину, см	Максимально припустима кількість тварин в клітці	Число тварин на 1 м2 площі полу приміщення
Миші	40	15	65 дорослих або 240 молодняку
Щури	150	10	20 дорослих або 100 молодняку
Мурчаки	300	5	15-18
Кролі	2000	1	3-4

- Стелажі розміщуються упродовж стін і повинні займати близько 0,4 м² виробничої площі.
- У кожному окремому приміщенні віварію рекомендується утримувати 1 вид тварин.
- Якщо за умовами досліду в одній секції разом утримуються тварини різних видів, розміщувати їх треба на різних стелажах. На кожній клітині з тваринами вивішують етикетку:

Відділення (лабораторія)	Прізвище дослідника
Клітка №...	Початок експерименту
Вид, лінія, стать тварин	Закінчення експерименту
Вік...	Особливі позначки
Дата надходження	

- На клітках інфікованих тварин закріплюють етикетки яскравого кольору. При догляді за тваринами, які заражені збудниками небезпечних інфекцій, персонал повинен надягати два халати, резиновий фартух, нарукавники, резинові рукавички, окуляри, маску та калоші.
- В приміщення, де знаходяться інфіковані тварини, можна входити тільки обслуговуючому персоналу та співробітникам, які беруть участь у дослідях.
- Труп тварин, які загинули в ході експерименту, до розтину зберігаються у спецхолодильнику (не більше 1 доби). Розтин проводить експериментатор. На розтині повинен бути присутнім представник віварію. Кожний випадок забою або загибелі тварини фіксується у спеціальному журналі

5. Прибирання і дезінфекція віварію

Прибирання віварію проводять **кожний** день вранці. Починають з **огляду тварин**, виявляючи захворівши та загинувши. Із клітин **виймають кормушки та поїлки**. Підлогу кожної клітки **чищать** віником та металевим скребком. **Залишки** їжі та калу зіскрібають совком і зкидують у металевий бак із щільної кришкою. Після всього скребком **зnezаражують**. Кормушки, поїлки миють гарячою водою із зольним лугом або содою, а потім обдають окропом. Переставляти кормушки та поїлки із однієї клітини в іншу не можна.

Потім протирається підлога, стіни, підвіконня гарячою водою або дезінфікуючим розчином.

- Прибирання проводять у спеціальному одягу: халаті, фартусі, косинці та резинових рукавичках.
- Один раз на 1,5-2 тижні, клітини тварин миють гарячою водою і дезінфікують гарячим зольним лугом або прожигают полум'ям паяльної лампи з метою профілактики інфекційних паразитарних захворювань і розмноження комах.
- Під час поточної дезінфекції тварин пересаджують у чисті, заздалегідь продезінфіковані клітки з підготовленими підстилками, кормушками і поїлками. Попередні клітки дезінфікують.

- Після закінчення прибирання, зібране сміття спалюють

6. Правила особистої гігієни працівників віварію

Кожний працівник віварію забезпечується **персональним** спецодягом спецвзуттям, рушником та милом. В нього повинна бути **індивідуальна** шафа з двома відділеннями. В одному - зберігаються протягом дня домашні речі, які робітник повинен зняти, приходячи на роботу; в іншому відділенні знаходиться спецодяг. **Кожний місяць індивідуальна шафа дезінфікується.** Після закінчення кожного етапу роботи, а також перед прийняттям їжі треба обов'язково **мити та дезінфікувати руки** (біля раковини рукомийника знаходяться бутилі з 2% розчином лізолу або хлораміну), а потім протирати вазеліном або дитячим кремом для попередження появи тріщин на шкірі.

- Після закінчення роботи персонал віварію повинен пройти обробку в санітарному блоці (душ).
- Всі особи, які приймаються на роботу з лабораторними тваринами, проходять медичне обстеження, включаючи на носії збудників туберкульозу та всієї групи кишкових інфекцій. У подальшому обстеження проводять не менше як 1 раз на рік. При виконанні робіт на тваринах експериментів із збудниками, які небезпечні для людей, обслуговуючий персонал віварію підлягає профілактичній імунізації.
- Для співробітників віварію проводиться інструктаж із техніки безпеки та охорони праці, правил внутрішнього розпорядку. Відповідальність за проведення інструктажу лежить на завідувачу віварієм.

7. Правила годування лабораторних тварин

Порушення режиму і раціону харчування, невиконання гігієнічних заходів при годуванні, сприяє послабленню організму тварин і підвищенню їх сприйняття різних інфекційних та соматичних захворювань. Виникнення їх протягом досліду може привести до невірних результатів експерименту та не вірним висновкам.

Лабораторних тварин годують 2-3 рази на добу у суворо встановлені години. Денний раціон треба розподіляти так, щоб різні види кормів чередувалися протягом дня

Основним видом харчування лабораторних тварин (гризунів) є зерна злакових олійних та бобових культур: овес, пшениця, кукурудза, просо, горох, сояшник, льон. Кукурудзу та горох треба давати подрібленими. Перед вживанням зернову суміш стерилізують в автоклаві при температурі 105 °C або в сухожаровій шафі протягом 40 хв. Поряд із зернами та насінням використовують продукти їх переробки: крупу, борошно, висівки, жмих. Висівки та жмих зволожують або змішують із вареною картоплею. Висівки кролям особливо молодняку вводити не можна - це визиває в них розвиток кокцидій (паразитує в епітеліальній тканині кишечника).

В останні часи використовують комбіновані корми у брикетах та грану пах кожний вид корму складений на певний вид тварин. Він містять постійну кількість білків, жирів, вуглеводів, мінеральних солей, мікроелементів і вітамінів. Обов'язковою умовою переходу на гранульовані корма є безперебійне забезпечення тварини чистою водою.

Для забезпечення водою тварин використовують *автопоїлки*. Це скляний флакон ємністю 200-250 мл із резиною пробкою, в отвір якої вставлена зігнута під кутом 120-140° скляна або металева, трубка з внутрішнім діаметром 6 мм. Поїлку кріплять на боковій стороні клітки або на кришці під невеликим ухилом, щоб кінець трубки заходив в клітку на відстань, зручну для злизування тваринами краплі, яка висить на кінці трубочки. Якщо автопоїлок немає, у клітках мишей та щурів повинні знаходитися мисочки з чистою водою. Кролів та морських свинок треба поїти 2 рази на добу, а у спеку - не менше 3 раз.