

Лекція 1

Тема: МЕТОДОЛОГІЯ І МЕТОДИ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

План:

1. Методологія дослідження
2. Поняття про науку. Біохімія, як наука, її сутність, цілі та напрямки досліджень
3. Методи біохімічних досліджень

Література:

1. Бірта Г. О. Методологія і організація наукових досліджень: навч. посіб. К. : «Центр учбової літератури», 2014. 142 с.
2. Губський Ю.І. Біологічна хімія: підручник / Ю.І. Губський. – К. : Нова книга, 2007. – 656 с.

1. Методологія дослідження

Вільна енциклопедія Вікіпедія дає таке визначення терміна «методологія» (від грец. Methodos - дослідження і logos - знання) – це вчення про науковий метод пізнання, а також сукупність методів, що застосовуються у будь-якій науці. **Методологія** - це спосіб дослідження явищ, підхід до досліджуваних явищ, планомірний шлях наукового пізнання і встановлення істини.

Методологія виконує такі функції:

- визначає способи здобуття наукових знань, які відображають динаміку процесів та явищ;
- передбачає особливий шлях, за допомогою якого може бути досягнута науково-дослідна мета;
- забезпечує всебічність отримання інформації щодо процесу чи явища, що вивчається;
- допомагає введенню нової інформації;
- забезпечує уточнення, збагачення, систематизацію термінів і понять у науці;
- створює систему наукової інформації, яка базується на об'єктивних явищах, і логіко-аналітичний інструмент наукового пізнання.

Найчастіше методологію тлумачать як теорію методів дослідження, створення концепцій, як систему знань про теорію науки або систему методів дослідження.

Метод (гр.. methodos) – спосіб пізнання, дослідження явищ природи і суспільного життя. Це також сукупність прийомів чи операцій практичного або теоретичного освоєння дійсності, підпорядкованих вивченню конкретного завдання.

Різниця між методом та теорією має функціональний характер: формулюючись як теоретичний результат попереднього дослідження, метод виступає як вихідний пункт та умова майбутніх досліджень. У найбільш загальному розумінні метод – це шлях, спосіб досягнення поставленої мети і завдань дослідження. Він відповідає на запитання: як пізнавати.

Методика (гр. methodike) - сукупність методів, прийомів проведення будь-якої роботи. **Методика дослідження** - це система правил використання методів, прийомів та операцій.



У науковому дослідженні часто застосовують метод критичного аналізу наукової і методичної літератури, практичного досвіду, як того потребує рівень методики і техніки дослідження. У подальшій роботі широко використовуються такі методи: спостереження, бесіда, анкетування, моделювання, експеримент та ін. До біологічних методів досліджень належать метод спостереження, порівняльний метод, експериментальний метод, моніторинг, моделювання, статистичний метод.

2. Поняття про науку. Біохімія, як наука, її сутність, цілі та напрямки досліджень

Наука – це система знань, об'єктивних законів природи, суспільства, мислення, що виражається у точних категоріях і має певну структуру.

Визначення науки поєднує два підходи до її розгляду:

- наука - це особливий вид пізнавальної діяльності, що спрямований на вироблення об'єктивних, системно організованих і обґрунтованих знань про світ;
- наука - це соціальний інститут, що забезпечує функціонування наукової пізнавальної діяльності. Найважливішими характеристиками та ознаками науки є предметність та об'єктивність.

Тому наука — це особлива форма людської діяльності, яка склалася історично і має своїм результатом цілеспрямовано відібрані факти, гіпотези, теорії, закони й методи дослідження.

Наука має **дисциплінарну структуру**, яка визначається поділом на галузі природознавства, суспільствознавства та технікознавства. На сьогодні до класу природознавчих наук входять і ті, що становлять основу спеціальності «Біологія»: **біохімія**.

Біохімія (від грец. βίος — «життя» і єгип. kēme — «Земля», також біологічна або фізіологічна хімія) — наука про хімічний склад організмів та їхніх складових частин та про хімічні процеси, що протікають в організмах.

Метою біохімії є вивчення

- 1) хімічного складу живих організмів, структури й функції кліткових компонентів: білків, вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот та інших біомолекул;
- 2) хімічних реакцій обміну речовин у живих організмах;
- 3) хімічних основ життя, законів перетворення хімічних реакцій у живих організмах у фізіологічні функції (роботу). Крім того, біохімія розглядає розкладення органічних речовин,

що пов'язано з виникненням ґрунтів, мулу, осадових гірських порід, покладів вугілля, нафти і горючих газів.

Біохімія — міждисциплінарна галузь, пов'язана як з хімією, так і з біологією, що вивчає будову та біологічні функції найважливіших компонентів живої матерії, насамперед біополімерів і низькомолекулярних біорегуляторів, акцентуючи увагу на з'ясуванні закономірностей взаємозв'язку між структурою та біологічною дією. Біохімія прагне відповідати на біологічні та біохімічні питання за допомогою хімічних методів. На базі її фундаментальних досліджень створюються технології одержання практично важливих препаратів для медицини, сільського господарства, різних галузей промисловості.

Відповідно до завдань дослідження з біохімії, розрізняють кілька напрямів, зокрема загальну і функціональну біохімію.

Загальна біохімія поділяється на статичну і динамічну. *Статична* біохімія вивчає складові хімічні частини організмів, їхній розподіл, фізико-хімічні та біологічні властивості. *Динамічна* біохімія досліджує шляхи перетворення певних сполук в організмах (окиснення, відновлення, гідролітичне і фосфоролітичне розщеплення, естерифікацію, синтез складних сполук з простіших тощо).

Функціональна біохімія вивчає біохімічні процеси, що лежать в основі проявів життєдіяльності організмів та окремих органів (живлення, асиміляцію та дисиміляцію, дихання, бродіння, ріст, розмноження, спадковість, подразливість, рухливість тощо), а також зміни цих процесів під впливом різних зовнішніх умов і внутрішніх факторів, пов'язаних з видовою належністю, віком і статтю організмів.

Відповідно до **об'єктів дослідження** розрізняють біохімію людини, тварин, рослин (фітобіохімія) і мікроорганізмів (всіх доменів життя).

Сучасна біохімія приділяє особливу увагу вивченню білків, які є матеріальною основою життя (ферментів, гормонів, антитіл тощо), вивченню обміну азотистих сполук, вуглеводів, жирів та ліпідів, вітамінів, мінеральних речовин (зокрема, мікроелементів); дослідженню впливу на процеси обміну деяких речовин, що стимулюють ріст, антибіотиків тощо. Докладно вивчаються біохімічні особливості нервової тканини, м'язів, печінки та інших органів та систем організму. Узагальнення біохімії допомагають висвітлити еволюцію органічного світу й питання про виникнення життя на Землі. Досягнення біохімії використовуються у медицині (клінічна біохімія), сільському господарстві (зоотехнічна біохімія і агробіохімія) та в харчовій і хіміко-фармацевтичній промисловості (технічна біохімія).

3. Методи біохімічних досліджень:

Біохімічні дослідження останнім часом все більше наближаються до розв'язання питань про внутрішні механізми регуляції в живій клітині, до вивчення молекулярних особливостей біохімічних процесів. У зв'язку з цим поступово ускладнюються методи та прилади, що використовуються у цій галузі науки.

- 1. Центрифугування.** Цей метод полягає в розділенні неоднорідних систем (суспензій, емульсій) в полі дії доцентрових сил. Під дією цих сил суспензії розділяються на тверду фазу – осад і рідку – центрифугат, який ще називають супернатантом або надосадовою рідиною. У біохімічних дослідженнях центрифугування використовують для очищення та фракціонування біологічного матеріалу – субклітинних органел, окремих макромолекул (ДНК, мітохондрій, білків тощо) з метою вивчення їх структури та біологічної активності.



2. Оптичні методи дослідження. Ці методи належать до найпоширеніших у біохімії.

Самий відомий метод – фотоколориметрія – це вимірювання поглинання видимої частини спектру забарвленими розчинами. Для наукових досліджень фотоколориметрія застосовується при визначенні активності ферменту супероксиддисмутази, загальної антиоксидантної активності плазми крові та еритроцитів, гідропероксидів ліпідів плазми крові, серомукоїдів сироватки крові тощо. У клінічній практиці цей метод використовують для кількісного визначення холестерину крові, активності креатинкінази, лужної та кислої фосфатази, визначення сечовини, тригліцеридів крові тощо.

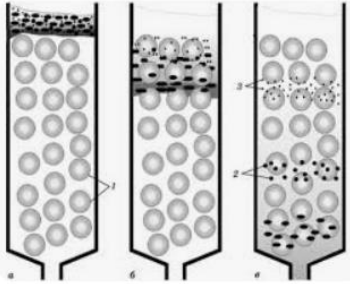


Електрофорез – це метод розділення заряджених частинок у електричному полі. У даний час метод електрофорезу широко використовують для фракціонування білків і ліпопротеїнів. Електрофорез у поліакриламідному гелі широко застосовують у клінічній практиці. За його допомогою можна розділити білки сироватки крові на 20 фракцій, тому що їх розподіл залежить не лише від заряду, а й від розмірів і форми білкових молекул.

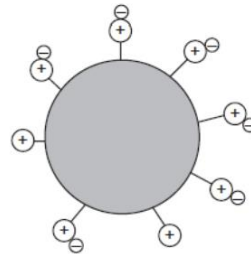
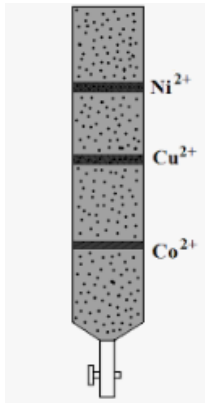


Хроматографічні методи. Для розділення та кількісного визначення білків і амінокислот, нуклеїнових кислот, вуглеводів, ліпідів та інших метаболітів використовують різні методи хроматографії, найважливішими з яких є:

- адсорбційна хроматографія, яка базується на різній здатності окремих сполук адсорбуватися на тих чи інших сорбентах;

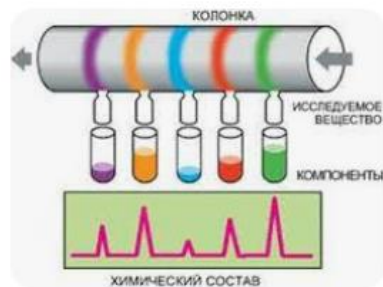
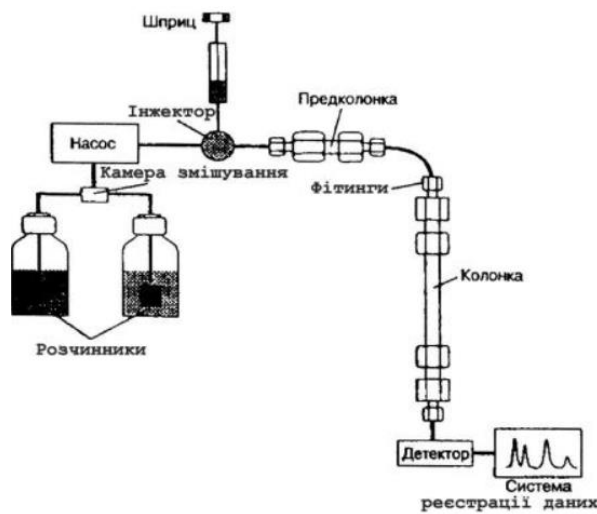


- іонообмінна – базується на різній здатності речовин, які розділяють, до іонного обміну з тим або іншим іоном. Іонообмінну хроматографію використовують в амінокислотних аналізаторах для визначення окремих амінокислот;

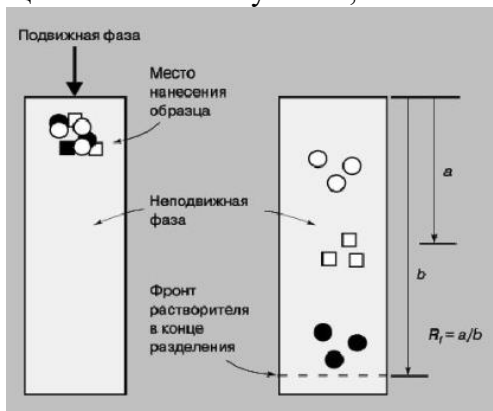


Схематичне зображення процесу закріплення речовини на іоніті

- високоефективну рідинну хроматографію широко використовують у фармакології при синтезі та визначенні лікарських засобів, у клінічній біохімії для визначення біологічно активних речовин у фізіологічних рідинах; у біотехнологічних процесах і виробництвах.



- розподільна; базується на різній розчинності речовин, які розділяють, у двох рідинах, що частково змішуються;



- дифузна; базується на розділенні речовин за швидкістю дифузії всередину сорбента (гель-фільтраційна хроматографія, при якій розділення речовин ґрунтується на механічному явищі молекулярного просіювання;

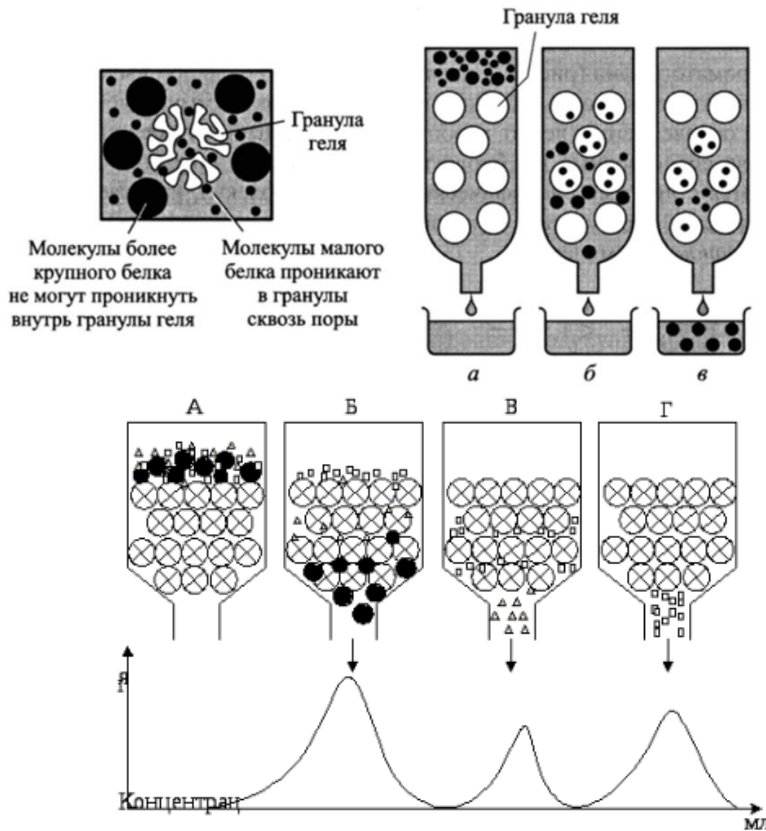
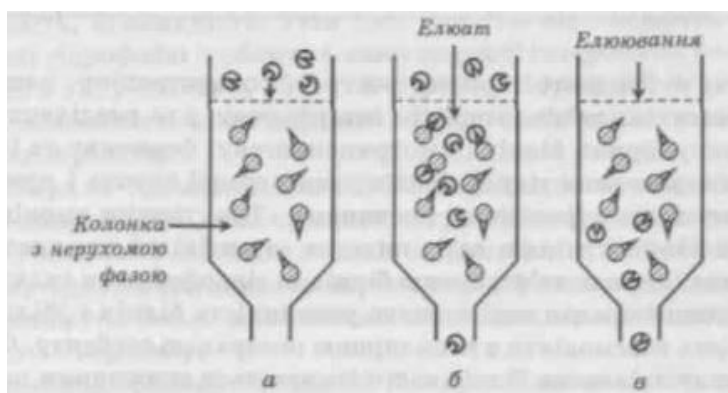


Схема гель-фільтрації:

а - на колонку, заповнену декстриновими гранулами, наноситься суміш великих та маленьких білків; *б* - у міру проходження вниз колонкою молекули малого білка проникають у гранули і затримуються; *в* - молекули більшого білка першими виходять із колонки змінюватися від 10 до 500 мкм). Гранули гелю мають внутрішні канали (пори), що характеризуються певним середнім розміром, від якого залежить їхня проникність. Суміш білків при пропусненні її через колонку залежно від розмірів окремих білкових молекул просторово поділяється. Великі білкові молекули, не здатні проникати в гранули гелю, переміщуються колонкою з високою швидкістю. Середні та дрібні білкові молекули утримуються у порах гелю залежно від розміру. У верхній частині колонки утримуються найдрібніші молекули через їхню високу здатність проникати всередину частинок гелю. При елюванні буферним розчином першими виходять найбільші молекули білків. Елюат збирають окремими фракціями.

- хроматографія за спорідненістю (афінна хроматографія) – високоспецифічний метод розділення різних сполук; базується на використанні нерозчинних форм біологічно активних речовин, що мають спорідненість до речовин, які розділяють.



Хроматографічні методи дослідження застосовують у фармацевтичній промисловості для розділення та очищення антибіотиків, пептидів, гормонів, амінокислот, нуклеїнових кислот, для очищення речовин від домішок, концентрування та розділення сумішей. Для наукових цілей хроматографія застосовується для дослідження механізмів ферментатичних реакцій, виявлення проміжних стадій метаболізму, розділення жирних кислот, спиртів, складних ефірів, амінів. За допомогою цього методу можна розділити будь-які радіоактивні ізотопи.

Імуноферментний аналіз (ІФА). У біохімії широко використовують методи, які поєднують імунні реакції з іншими фізико-хімічними методами – хроматографічні методи в імунології, імунофлюоресцентний аналіз, імуноелектрофорез і радіоімунний аналіз.

Одне з провідних місць в імунологічних дослідженнях належить імуноферментному аналізу. Це метод поєднує в собі високу специфічність імунологічних реакцій з чутливою каталітичною дією ферментів. ІФА використовують для вивчення будови та функції білків, їх біосинтезу й катаболізму, для визначення широкого класу речовин – гормонів, онкомаркерів, серцевих алкалоїдів, антибіотиків, наркотиків та інших фармакологічних речовин, а також вірусів, бактерій і антитіл проти них тощо.

Основою цього методу є реакція „антиген-антитіло”, тобто специфічне зв’язування антитіла з певною речовиною.

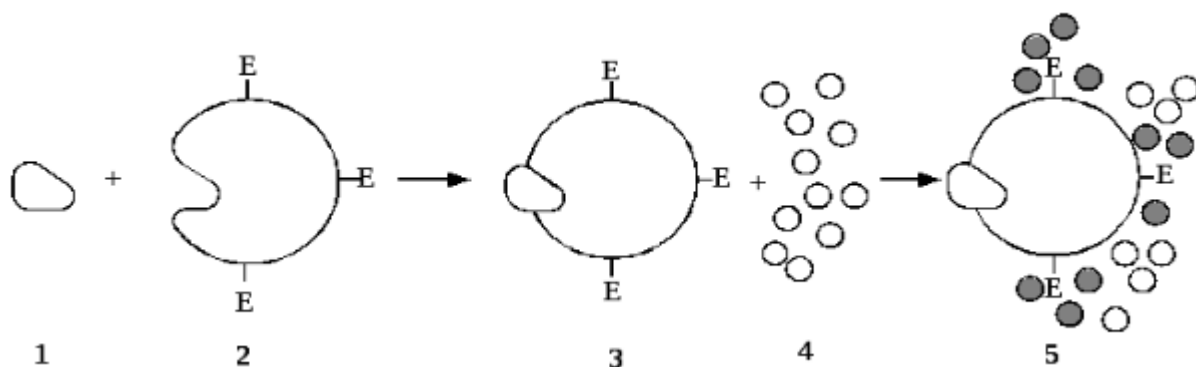


Схема прямого методу твердофазного ІФА: 1 – антиген, що міститься в зразку; 2 – антитіла, мічені ферментом (Е); 3 – комплекс антиген-антитіло-фермент; 4 – субстрат; 5 – комплекс антиген-антитіло-фермент, який утворив продукти реакції

Для ІФА використовують широке коло ферментів: пероксидазу, лужну фосфатазу, галактозидазу, глюкозидазу, уреазу, пірофосфатазу тощо.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) застосовується у діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом. Реакція дозволяє множити певні нуклеотидні послідовності до кількостей, які можна виявити методом молекулярної гібридизації за допомогою електрофорезу. ПЛР є багаторазно повторюваними циклами синтезу (ампліфікації)

специфічної ділянки ДНК-полімерази, дезоксинуклеозидтрифосфатів, відповідного сольового буферу та олігонуклеотидних затравок - праймерів, які визначають межі ампліфікованої ділянки ДНК-мішені.

Для діагностики кожної інфекції підбираються системи праймерів, комплементарних специфічним для збудника ділянках генів, які дозволяють ампліфікувати фрагмент, який має для кожної системи праймерів свою довжину.

ПЛР застосовується у клініці для діагностики гонореї, трихомоніазу, цитомегаловірусу, мікоплазму, уреоплазму, герпесу тощо.

