



Молекулярна фізіологія: вісцеральні системи

Тема 11. Практикум: підготовка до фізіологічного експерименту

Олексій Болдирєв

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України
«Моя наука»

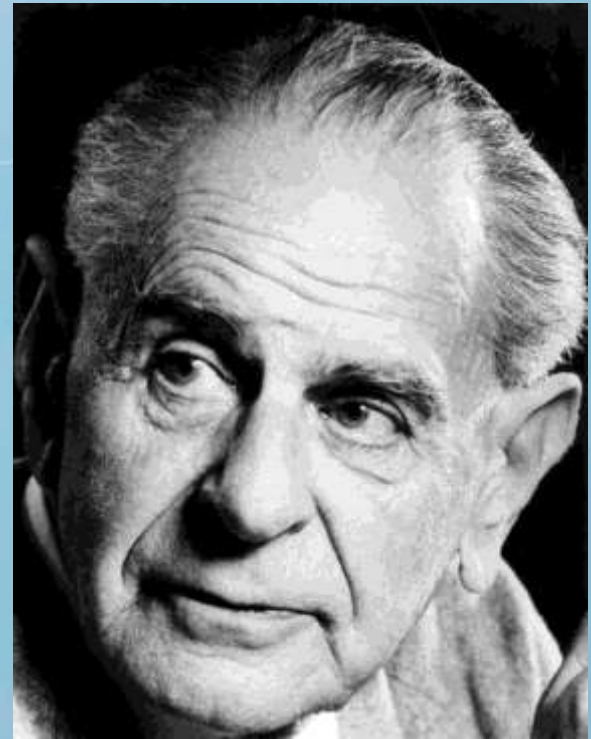


Як працює наука?

- Френсіс Бекон і Рене Декарт
- Індуктивний і дедуктивний метод
- Гіпотетико-дедуктивний метод

Фальсифікаціонізм

- Науковою є та гіпотеза, яку можна потенційно спростувати емпірично (хоча б уявно)



Карл Поппер

Емпіричні методи

- Експеримент vs. Інструментальне спостереження
- Експеримент: контрольовані умови
 - Чи ефективна вакцинація проти Covid-19 вакциною А?
 - Чи білок BPVMF експресується в гепатоцитах?
 - Який тип кальцієвих каналів відповідає за плато в потенціалі дії кардіоміоцита?

Дизайн експерименту

- Формулювання гіпотези
- Що вимірювати та як?
- Які зміни є важливими для мене, а які ні?
- Чому я впевнений, що виміряні зміни є наслідком експериментальних умов, а не чогось ще?
- Розмір вибірки й статистичні методи
- Контролі!
- «Bias»: особисті упередження

Нащо готуватися?

- Одна серія експериментів у біології триває в середньому від 2-3 місяців до пів року... це значить, що за активне життя експериментатор/ка можуть поставити таку кількість експериментів, що виражається **двозначним числом**



Петро Старокадомський

Дизайн експерименту

- Формулювання гіпотези
- **Що вимірювати та як?**
- **Які зміни є важливими для мене, а які ні?**

Виміри

- **Незалежна змінна** – величина, яка змінюється за задумом експерименту (кількість речовини блокатора), незалежна від ходу експерименту
- **Залежна змінна** – величина, зміну якої ми вимірюємо, як наслідок введення незалежної змінної; вимірюваний параметр (зміна тиску в організмі, трансмембранний струм тощо)

Дизайн експерименту

- Формулювання гіпотези
- Що вимірювати та як?
- Які зміни є важливими для мене, а які ні?
- **Чому я впевнений, що виміряні зміни є наслідком експериментальних умов, а не чогось ще?**

Сторонні фактори

- Чоловіки, що годували мишей, збільшували рівень стресу та зменшували рівень больових відповідей



Дизайн експерименту

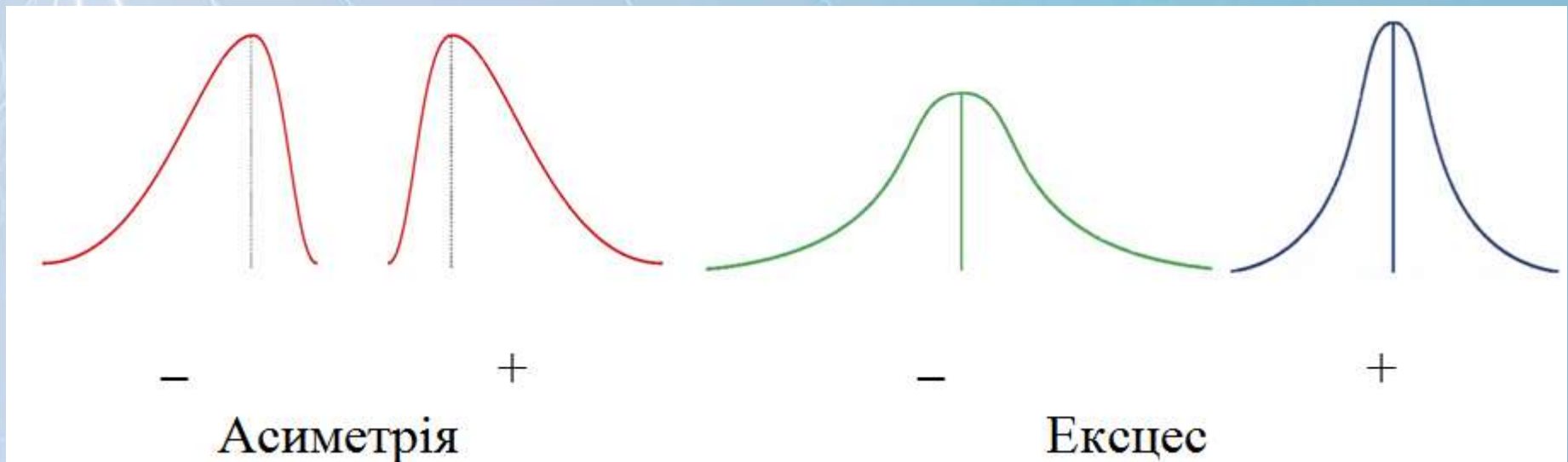
- Формулювання гіпотези
- Що вимірювати та як?
- Які зміни є важливими для мене, а які ні?
- Чому я впевнений, що виміряні зміни є наслідком експериментальних умов, а не чогось ще?
- **Розмір вибірки й статистичні методи**

Як обрати статистичний метод?

- Який розмір вибірки потрібно взяти?
- Який характер розподілу даних у генеральній сукупності?
- Чи достатня статистична сила в обраного методу?

Типи розподілів

- Нормальний розподіл
- Інші розподіли: асиметрія та ексцес



Статистична сила методу

- Імовірність того, що метод виявить відмінності між генеральними сукупностями, якщо ці відмінності реально існують
- *Силу можна коригувати розміром вибірки*
- *Силу методу потрібно оцінити ДО початку експериментів!*

Неточності перекладу

- Sample = вибірка
- Sample = зразок
- Коли питають, how many independent samples do you have, мова йде здебільшого про вибірки

Дизайн експерименту

- Формулювання гіпотези
- Що вимірювати та як?
- Які зміни є важливими для мене, а які ні?
- Чому я впевнений, що виміряні зміни є наслідком експериментальних умов, а не чогось ще?
- Розмір вибірки й статистичні методи
- **Контролі!**

Контролі!

- Контрольна група – точно така ж репрезентативна вибірка
- Контрольна група має відрізнятися тільки за незалежною змінною
- Це значить, що контрольна група має бути такою ж гомогенною та чисельною, як і дослідна

Don't. Do. It.

«Візьмемо зараз 2 контрольних щурів і 10 експериментальних, а потім доробимо стільки контрольних, скільки треба»



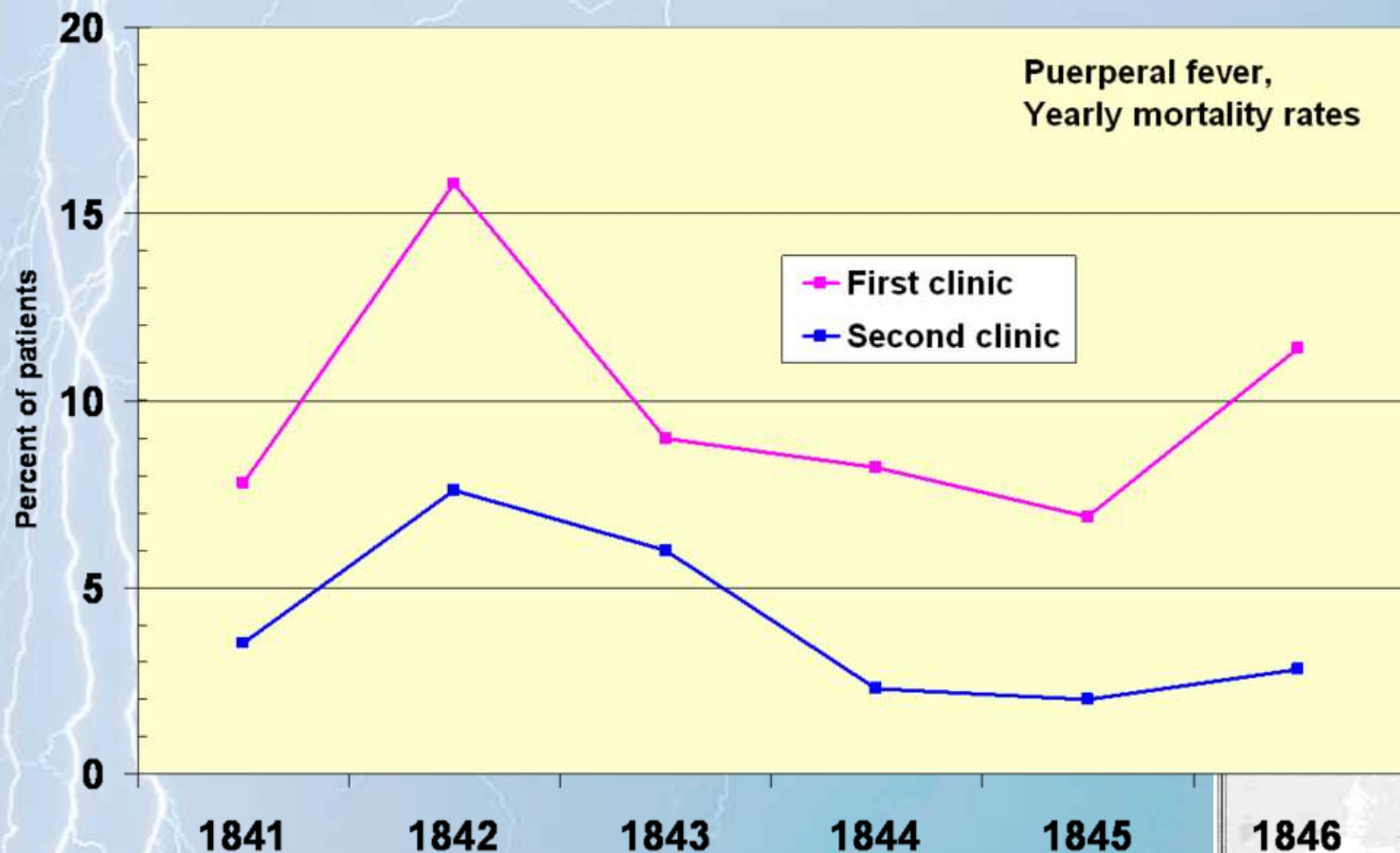
Дизайн експерименту

- Формулювання гіпотези
- Що вимірювати та як?
- Які зміни є важливими для мене, а які ні?
- Чому я впевнений, що виміряні зміни є наслідком експериментальних умов, а не чогось ще?
- Розмір вибірки й статистичні методи
- Контролі!
- «Bias»: особисті упередження

Упередження важливі

- Рудольф Вірхов (антиєволюціоніст): неандерталець це не давня людина, а російський козак з артритом
- Ігнацій Земмельвейс: руки треба мити перед пологами (а також Джозеф Лістер: і взагалі в хірурга мають бути чисті руки)

Дослідження Земмельвейса

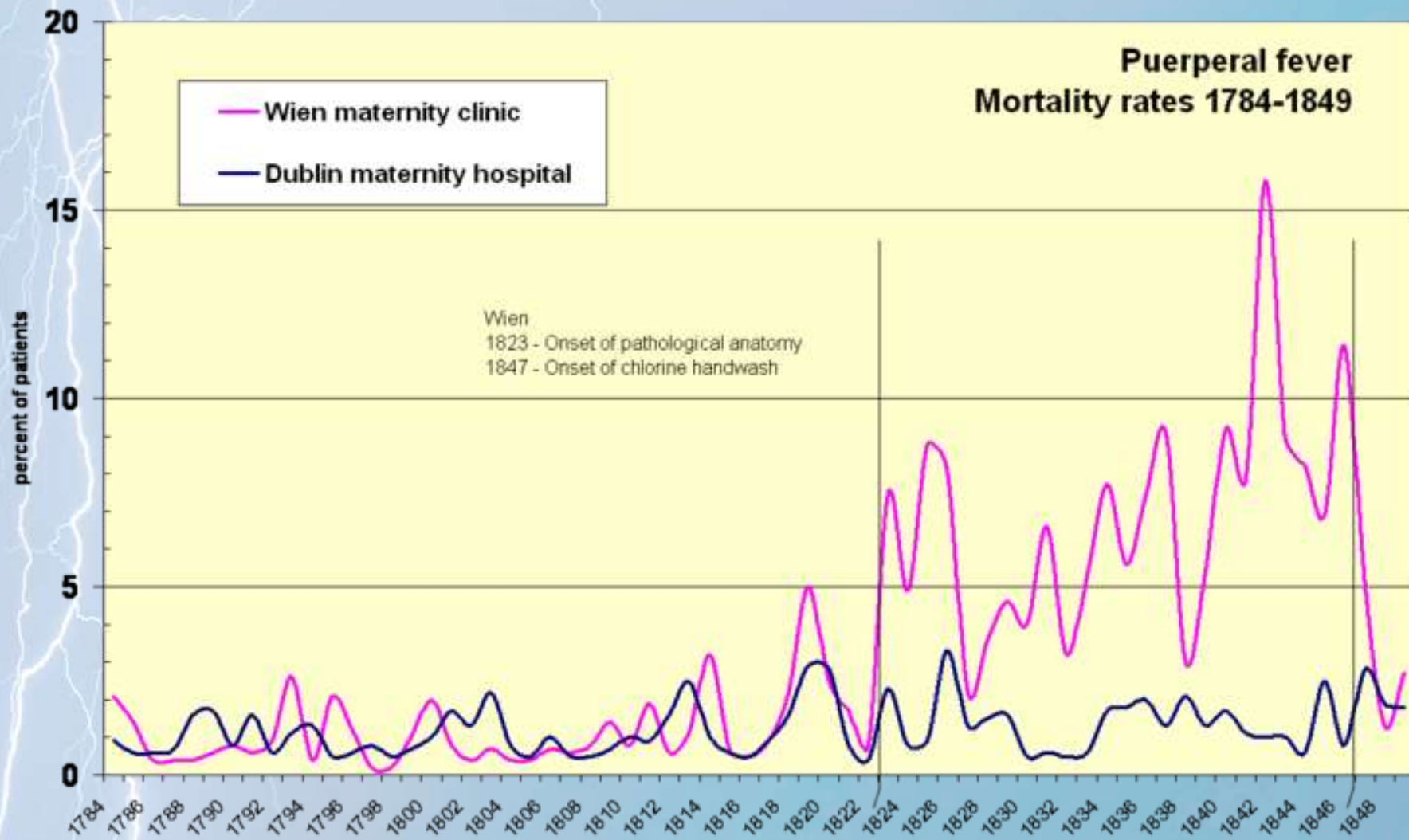


Puerperal fever
Monthly mortality rates 1841-1849

Chlorine handwash

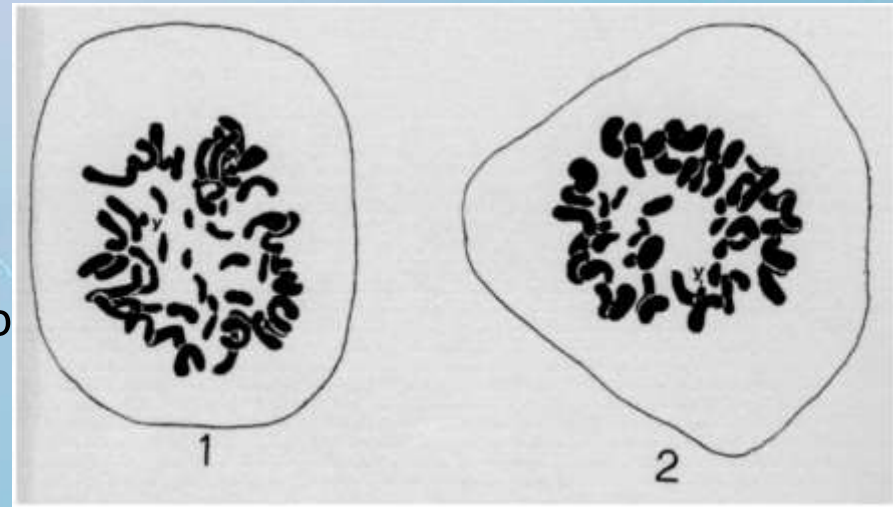
Year	Month	Percent of patients
1841	Jan	14.5
1841	Feb	7.5
1841	Mar	4.5
1841	Apr	1.5
1841	May	8.5
1841	Jun	5.0
1841	Jul	1.5
1841	Aug	2.0
1841	Sep	11.0
1841	Oct	22.5
1841	Nov	21.0
1841	Dec	12.0
1842	Jan	10.0
1842	Feb	10.5
1842	Mar	3.0
1842	Apr	6.5
1842	May	21.0
1842	Jun	25.5
1842	Jul	18.5
1842	Aug	29.5
1842	Sep	23.0
1842	Oct	31.5
1842	Nov	19.0
1842	Dec	16.0
1843	Jan	12.0
1843	Feb	12.0
1843	Mar	6.0
1843	Apr	4.0
1843	May	1.5
1843	Jun	2.0
1843	Jul	17.5
1843	Aug	7.0
1843	Sep	8.0
1843	Oct	15.0
1843	Nov	11.0
1843	Dec	17.0
1844	Jan	17.0
1844	Feb	5.5
1844	Mar	2.5
1844	Apr	4.5
1844	May	6.0
1844	Jun	1.0
1844	Jul	3.0
1844	Aug	11.0
1844	Sep	10.5
1844	Oct	7.5
1844	Nov	4.5
1844	Dec	4.5
1845	Jan	4.0
1845	Feb	4.5
1845	Mar	7.0
1845	Apr	6.0
1845	May	15.0
1845	Jun	10.5
1845	Jul	13.5
1845	Aug	18.0
1845	Sep	15.5
1845	Oct	19.0
1845	Nov	13.5
1845	Dec	10.0
1846	Jan	13.0
1846	Feb	18.0
1846	Mar	15.5
1846	Apr	19.0
1846	May	10.0
1846	Jun	13.0
1846	Jul	18.0
1846	Aug	14.5
1846	Sep	15.0
1846	Oct	10.5
1846	Nov	5.5
1846	Dec	3.0
1847	Jan	2.0
1847	Feb	3.5
1847	Mar	18.5
1847	Apr	12.0
1847	May	2.0
1847	Jun	1.5
1847	Jul	4.5
1847	Aug	4.5
1847	Sep	4.5
1847	Oct	3.0
1847	Nov	3.5
1847	Dec	0.5
1848	Jan	0.0
1848	Feb	1.0
1848	Mar	1.0
1848	Apr	1.0
1848	May	1.0
1848	Jun	0.5
1848	Jul	1.0
1848	Aug	2.5
1848	Sep	3.0
1848	Oct	1.5
1848	Nov	2.0
1848	Dec	3.0
1849	Jan	2.0
1849	Feb	3.0
1849	Mar	5.0

Дослідження Земмельвейса



Упередження лише в далекому минулому?

- 1842 – відкриття хромосом у рослин
- 1878 – відкриття хромосом у тварин
- 1910-ті – описи перших каріотипів
- **1923 – кількість хромосом у людини визначена як 48**
- (Купа відкриттів, пов'язаних з генетикою)
- 1939 чи 1944 – відкриття генетичної функції ДНК
- 1953 – відкриття подвійної структури ДНК
- **1956 – кількість хромосом у людини визначена як 46**



Але упередження не завжди такі очевидні!

- Несвідомо перемішуємо експериментальні пробірки ретельніше, ніж контрольні
- Довше витримуємо клітини для стабілізації струму там, де очікуємо більшого струму
- Плацебо-ефект як вплив лікаря-експериментатора
- Що робити? Знеособлювати, рандомізувати

Експерименти мають бути етичними

- Що таке етика?
 - Спосіб відрізнити правильну поведінку від неправильної
 - Певні правила
 - Переважно неусвідомлені

Корені біоетики

- Пацієнти мають права
- Тварини мають моральний статус
- Потужний культурний вплив християнства

Тваринна біоетика

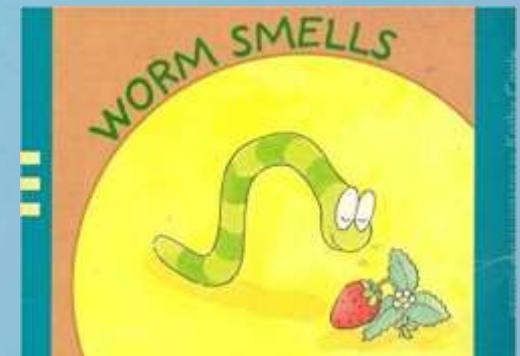
- Аристотель, Аквінський, Кант: тварина не має морального статусу, бо не мислить
- Мілль і Бентам (XVIII ст.): важливе не мислення, а страждання
- Пітер Сінгер (1970-ті): «видизм» нічим не краще за сексизм та расизм

Етичні підходи

- Деонтологія: дії мають відповідати етичним правилам (релігійні чи кантіанські)
- Утилітаризм: дії мають бути спрямовані на зменшення шкоди та збільшення задоволення життям
- 4-принципна мораль: автономія, не нашкодь, корисність, справедливість
- Етика чесноти (virtue): маємо вчиняти так, як би діяла високоморальна ідеальна істота

(Само)обмеження тваринних моделей

- Заборона роботи з шимпанзе
- Обмеження роботи з ссавцями
- Нейронауки на дрозоді й *Caenorhabditis*
- **Що припустимо?**



Чому тварини не мають страждати?

- Бо страждання це погано
- Науковці попри власні етичні вподобання не мають виглядати монстрами на тлі етичної норми суспільства
- Модельні тварини в стресовому стані дають ненадійні результати

Принципи роботи з тваринами

- Повага до тварин
- Альтернативні до тварин моделі (Replace)
- Баланс між стражданням та науковою користю
- Зменшення кількості тварин (Reduce)
- Зменшення страждань і поліпшення умов (Refine)
- Збереження біорізноманіття та непорушення оселищ
- Відкритість даних і уникнення додаткових експериментів
- Знання біології тварин
- Якісний догляд

Як робити евтаназію?

- Анестезія – тільки перевірені реагенти
- Декапітація – залежно від розміру тварини
- Перевірити, чи настала смерть
- Спеціальне навчання, нагляд комітету з біоетики
- Заборонені: діетиловий ефір, хлороформ, стрихнін

Етика змінюється з часом

- Перевірте сучасні вимоги на сайтах провідних університетів чи організацій з біоетики!
- Наприклад:
 - Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing. 2nd edition.
 - Center for practical bioethics <https://www.practicalbioethics.org/what-is-bioethics>
 - Michigan State University <https://bioethics.msu.edu/what-is-bioethics>
 - Норвезька агенція <https://www.forskningsetikk.no/en/guidelines/science-and-technology/ethical-guidelines-for-the-use-of-animals-in-research/>
 - AVMA guidelines for the euthanasia of animals <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>

Безпосередня підготовка

- Перевірити реактиви (в наших умовах – за місяць-два)
- Підготувати посуд і прилади
- Підготувати лабораторний журнал: методики, таблички для даних тощо
- Оберіть час роботи: щоб ніхто не заважав (особливо з обладнанням загального користування)
- Провести пілотний експеримент (якщо можливо)



Вдалих експериментів!