

**Мельничук С.Д., Пахомова В.А., Пахомова О.О., Протункевич О.О.,  
Коновалов М.Ф., Протункевич М.С., Соломатін О.Р.**

**МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СТАНУ  
І МЕТАБОЛІЧНОЇ СИСТЕМИ ЙОГО РЕГУЛЯЦІЇ**

**Одеса – 2023**

**УДК 616-071-074:577:612.121.2/3**

**Методи визначення кислотно-основного стану і метаболічної системи його регуляції**

У книзі представлені матеріали досліджень кислотно-основного стану (КОС) традиційним методом (по рН,  $p\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) та за допомогою біохімічних методів дослідження метаболічної системи регуляції кислотно-основного гомеостазу в організмі людини та тварин. Розглядається та аналізується інформація про зв'язки між кислотно-лужними показниками гомеостазу організму в нормі та при моделюванні у піддослідних тварин порушень КОС – метаболічних ацидозу та алкалозу, що визначаються як традиційним методом, так і методами біохімічних досліджень базисних метаболічних процесів та вмісту основних метаболітів, ключових ферментів гліколізу та циклу трикарбонових кислот, що забезпечують стабільну життєдіяльність на клітинно-молекулярному рівні.

Застосовуваний у практичній медицині метод визначення кислотно-основного стану (КОС) у крові за показаннями рН,  $p\text{CO}_2$  та вмісту  $\text{HCO}_3^-$  у деяких випадках помилковий. Так, наприклад, при явищах метаболічного алкалозу компенсується надлишковим утворенням органічних кислот у гліколізі та циклі трикарбонових кислот, що діагностують як метаболічний ацидоз через деякий час при їх накопиченні. Стан метаболічного ацидозу характеризується підвищенням відновлювальних властивостей та активацією процесів ліполізу та глюконеогенезу, тоді як метаболічний алкалоз викликає

посилення окисних властивостей, активацію гліколізу та циклу трикарбонних кислот. Це пояснюється компенсаторними змінами метаболічної системи регулювання КОС, дослідження якої проводилися останні десятиліття.

В книзі наведено біохімічні методики досліджень базисних метаболічних процесів та окисно-відновних реакцій, що беруть участь у підтримці кислотно-основного гомеостазу організму, у тому числі в оригінальній розробці, на деякі були отримані авторські свідоцтва та патенти.

Книга призначена для науковців, лікарів, викладачів та студентів ВНЗ.

Автори: академік НААН України, д.біол.н., професор С.Д. Мельничук, д.мед.н. Пахомова В.А., к.біол.н. Пахомова Є.О., к.біол.н. Протункевич О.О., к.мед.н. Коновалов М.Ф., Протункевич М.С., Соломатін О.Р.

Рецензенти:

– завідувач кафедри фармакології та технології ліків Одеського національного університету ім. І.І. Мечнікова, доктор медичних наук, професор Грицук Олександр Іванович,

– зам. начальника науково-організаційного відділу дослідних робіт, патентної та винахідницької роботи Одеського національного медичного університету, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Кравченко Людмила Сергіївна.

Рекомендовано до друку Вченою радою Одеського національного медичного університету протокол № 2 від 05.10.2023 року.

ISBN

## ЗМІСТ

	Перелік умовних скорочень.....	6
	ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ I.	МОЖЛИВІ ПОМИЛКИ ЗАГАЛЬНОПРИНЯТОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СТАНУ У ТКАНИНАХ І РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ І ТВАРИН (обґрунтування обраного напрямку).....	10
РОЗДІЛ II.	МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЧНОЇ СИСТЕМИ ПІДТРИМАННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО ГОМЕОСТАЗУ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН .....	28
2.1.	Окисно-відновні властивості в тканинах та рідинах організму.....	29
2.1.1.	Колориметричний метод визначення SH-груп і SS-зв'язків у білках та низькомолекулярних сполуках за допомогою 5,5'-дітіобіс(2-нітробензойної) кислоти – ДТНБК.....	29
2.1.2.	Визначення вмісту окислених та відновлених нікотинамідних коферментів у біологічних тканинах.....	32
2.2.	Визначення діабетоподібної спрямованості обмінних процесів та окислювального стресу.....	34
2.2.1.	Визначення активності ключового ферменту глюконеогенезу – фруктозодифосфатази.....	35
2.2.2.	Визначення активності ключового ферменту гліколізу – піруваткінази.....	38

2.2.3.	Визначення активності НАД- та НАДФ-залежних малатдегідрогенази та ізоцитратдегідрогенази – ключових ферментів циклу трикарбонових кислот та біосинтетичних процесів.....	40
2.3.	Роль перекисного окислення ліпідів при метаболічному ацидозі та алкалозі.....	43
2.3.1.	Визначення вмісту малонового діальдегіду.....	43
2.3.2.	Визначення активності глутатионредуктази.....	44
2.4.	Система оксиду азоту – регулятор судинного тонусу.....	46
2.4.1.	Визначення вмісту нітратів та нітритів.....	47
2.4.2.	Визначення активності синтази оксиду азоту.....	49
2.5.	Метод дослідження кислотно-лужної рівноваги у крові ...	51
	ЛІТЕРАТУРА.....	52

## Перелік умовних скорочень

АДФ - аденозинтрифосфат,  
АТФаза - аденозинтрифосфатаза,  
КЛР - кислотно-лужна рівновага,  
КОС – кислотно-основний стан,  
ЦТК – цикл трикарбонових кислот,  
NAD - нікотинамідаденіндинуклеотид,  
NADH - нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений,  
NADP - нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат,  
NADPH - нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат відновлений,  
NAD-ІДГ – НАД<sup>+</sup>-залежна ізоцитратдегідрогеназа,  
NAD-МДГ – НАД<sup>+</sup>-залежна малатдегідрогеназа,  
NADP-ІДГ – НАДФ<sup>+</sup>-залежна ізоцитратдегідрогеназа,  
NADP-МДГ – НАДФ<sup>+</sup>-залежна малатдегідрогеназа,  
НФ – неорганічний фосфат,  
ТХО – трихлороцтова кислота,  
ЕДТА - етилендіамінтетраоцтова кислота,  
ФдФ-аза – фруктозодифосфатаза,  
Г6Ф-аза – глюкозо-6-фосфатаза,  
ПОЛ – перекисне окислення ліпідів,  
SH-групи - сульфгідрильні групи,  
SS-групи - дисульфідні групи,  
pO<sub>2</sub> - парціальний тиск кисню,  
pCO<sub>2</sub> – парціальний тиск вуглекислого газу.

## ВСТУП

Концентрація  $H^+$  у плазмі крові та інших рідинах організму належить до найбільш строго регульованих змінних у фізіології людини. Однак механізми, відповідальні за клітинний, локальний, регіональний та системний кислотно-лужний гомеостаз, потужні регуляторні ефекти яких проявляються на рівні клітини, органу та організму /1/, вивчені не повністю.

У літературі є розбіжності щодо того, які методи слід використовувати для розуміння цих механізмів. Більшість цих розбіжностей існує тільки тому, що суворі правила причинно-наслідкового зв'язку (на відміну від методів статистики) не часто застосовувалися до розуміння кислотно-основного балансу, а клінічно корисні методи часто використовувалися для розуміння фізіології без належного детального вивчення.

Відмінність між незалежним і залежним, між причинністю та кореляцією так само важлива для розуміння кислотно-основного стану в фізіології, як і для будь-якої іншої галузі науки. Тільки шляхом ретельного аналізу змінних показників можна визначити механізми, що підтримують та регулюють кислотно-лужний гомеостаз організму.

Нездатність точно виявити фізіологічні та біохімічні закономірності, причинно-наслідкові зв'язки, призвела до невірних уявлень про кислотно-основний стан в нормі та при розвитку різних патологічних процесів і викликала багаторічні, часто спекотні суперечки /2, 3, 4, 5/. Недостатня вивченість залучення до адаптаційно-компенсаторної реакції організму при розвитку порушень кислотно-основного гомеостазу базисних метаболічних процесів, що

забезпечують стабільну життєдіяльність на клітинно-молекулярному рівні, призвела до нерозуміння механізмів компенсаторних реакцій та ступеня їх напруги.

Відомо, що при пред'явленні організму надмірно високих вимог, що перевищують функціональні можливості детермінованих механізмів загальної неспецифічної адаптаційної реакції (стрес-реакції), можливий розвиток наступних якісних ознак екстремального стану /6/:

- гранична напруга функціональних механізмів термінової адаптації з високою ймовірністю їх зриву та незворотної декомпенсації;
- залучення до адаптаційно-компенсаторної реакції «тилової зони оборони» організму – базисних метаболічних процесів, що забезпечують стабільну життєдіяльність на клітинно-молекулярному рівні;
- допустимість сприятливого результату.

Авторами передбачається, що саме остання ознака відрізняє екстремальний стан, що розвивається на тлі повного або відносного здоров'я, від передтермінального стану, що спостерігається за будь-якого патологічного процесу у разі його несприятливого перебігу /6/. Відстеження перебігу та розвитку компенсаторних процесів допоможе виявити різноманітні функціональні механізми забезпечення сталості внутрішньоклітинного середовища в організмі, у тому числі при порушеннях кислотно-основного стану.

Окрім широко відомих трьох основних систем підтримки кислотно-основного гомеостазу в організмі людини та тварин (респіраторної, екскреторної та буферної) встановлено існування ще четвертої – метаболічної /7-13/. Ця система є сукупністю



альтернативних змін спрямованості та інтенсивності обміну вуглеводів, ліпідів, білків і нуклеїнових кислот, що мають місце безпосередньо в клітинах при порушенні в організмі кислотно-основного стану (КОС). Фізіологічний зміст зазначених змін метаболізму полягає в регулюванні інтенсивності взаємоперетворень сильних органічних кислот та основ у слабші кислоти та основи або нейтральні сполуки та навпаки.

Нами встановлено, що на ранніх етапах зміни КОС крім буферної системи для забезпечення сталості внутрішньоклітинного рН включаються гомеостатичні молекулярні механізми тканин, спрямовані на зв'язування надлишку протонів при ацидозі та утворення органічних кислот у разі дефіциту протонів при алкалозі, так звана метаболічна система регуляції /7–13/.

У книзі розглядається інформація про зв'язки між кислотно-основними змінними гомеостазу організму в нормі та при моделюванні у піддослідних тварин порушень КОС, що визначаються традиційним методом у крові, та методами біохімічних досліджень базисних метаболічних процесів у тканинах піддослідних тварин, що визначають активність ферментів та вміст основних метаболітів, що забезпечують стабільну життєдіяльність на клітинно-молекулярному рівні та загальні для більшості клітин та живих організмів.

## **РОЗДІЛ I. МОЖЛИВІ ПОМИЛКИ ЗАГАЛЬНОРИЙНЯТОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СТАНУ (обґрунтування обраного напрямку)**

Концентрація  $H^+$  у крові та інших рідинах організму відноситься до найбільш строго регульованих показників у фізіології людини та забезпечує повноцінність метаболічних процесів у внутрішніх середовищах організму, що протікають у клітинах та тканинах. Значення показника рН залежать від співвідношення між позитивно зарядженими іонами (що формують кислотне середовище) і негативно зарядженими іонами (що формують основне середовище).

Організм людини чи тварини завжди прагне врівноважити це співвідношення, підтримуючи певний рівень рН, що визначає: фізико-хімічні властивості колоїдних структур; активність та конформацію білків; чутливість клітинних рецепторів; проникність клітинних мембран; регулює судинний тонус; визначає стан дихального центру; впливає на стан центральної нервової системи та ін.

Однак механізми, відповідальні за клітинний, локальний, регіональний та системний кислотно-основний гомеостаз, потужні регуляторні ефекти яких виявляються на рівні клітини, органу та організму, не повністю вивчені /1/. У літературі є розбіжності щодо того, які методи слід використовувати для розуміння цих механізмів.

Більшість цих розбіжностей існує лише тому, що суворі правила причинно-наслідкового зв'язку (на відміну від методів статистики) не часто застосовувалися до розуміння кислотно-основного гомеостазу, а

клінічно корисні методи часто використовувалися без розуміння фізіології та докладного вивчення.

Відмінність та взаємозв'язки між залежним та незалежним, між причинністю та кореляцією важлива при вивченні кислотно-основної фізіології. Тільки за допомогою детального вивчення певної послідовності змін можна визначити основні діючі механізми регуляції та компенсації кислотно-основного гомеостазу.

Тому дослідження кислотно-основного стану та його зв'язку з компенсаторними процесами організму, уточнення критеріїв, можливостей та меж використання традиційних методів дослідження залишається актуальною проблемою в медицині, яка є складною та багатокomпонентною, що потребує мультидисциплінарного підходу до вирішення питань, що виникають перед клініцистами.

Метою роботи було проведення біохімічних досліджень та аналіз отриманої інформації про зміни кислотно-основного стану, що визначаються традиційним методом у крові за допомогою газового мікроаналізатора ("Radelkis", Угорщина), при моделюванні у випробуваних тварин (щурів) порушень КОС – метаболічного ацидозу та алкалозу, порівняно з контрольною групою протягом тривалого часу – 5 місяців.

Компенсований метаболічний ацидоз та алкалоз у білих щурів моделювали способом, розробленим Н.І.Журавським та Д.А. Мельником /14, 15, 16, 17/. Щури, у яких моделювали метаболічний ацидоз, протягом місяця щодня отримували з їжею (до дачі основного корму) додатково хлорид амонію у дозі 4 мг на 1 г маси тварин. Для моделювання метаболічного алкалозу до раціону тварин додавали

бікарбонат натрію в дозі 5 мг на 1 г маси щурів. Контрольна група тварин одержувала в еквімолярній кількості хлорид натрію. Дослідження показників кислотно-основного стану крові щурів (рН, рСО<sub>2</sub>, рО<sub>2</sub>), забраної з хвостової вени під вазелінову олію, проводили через 3 дні, 1 та 2 тижні, 1, 2 та 5 місяців від початку моделювання ацидозу та алкалозу на біологічному мікроаналізаторі фірми "Radelkis" (Угорщина). Розрахунки вмісту бікарбонатів та діагноз кислотно-основного стану здійснювали за допомогою номограм.

Механізм досягаемого ефекту при моделюванні метаболічного ацидозу полягає у зв'язуванні іоном амонію  $\alpha$ -кетоглутарату та оксалоацетату, зниженні функціонування циклу трикарбонових кислот, зниженні вмісту СО<sub>2</sub> з подальшим розвитком ацидотичного стану /7-9/. Збільшення ж вмісту бікарбонату натрію в раціоні тварин при моделюванні метаболічного алкалозу змінює стан електролітного балансу та збільшує вміст основних еквівалентів у тканинах та рідинах /18, 19, 20/.

Про кислотно-основний стан в організмі піддослідних тварин судили також щодо розвитку характерних компенсаторних механізмів та порушень основних метаболічних процесів при моделюванні метаболічного ацидозу та алкалозу у тканинах піддослідних тварин /8, 9/.

Компенсований метаболічний ацидоз або алкалоз важко визначити за допомогою загальноприйнятого методу за показниками крові (рН і рСО<sub>2</sub>), тому що ці показники відображають передусім компенсаторні зміни з боку дихальної та видільної систем. Крім того, при явищах гіперкомпенсації метаболічного алкалозу шляхом надмірного

вироблення органічних кислот визначають явища метаболічного ацидозу. У зв'язку з цим, у роботі судили насамперед про зрушення кислотно-основного стану за компенсаторними механізмами, так званої метаболічної системи регуляції кислотно-основного гомеостазу, що здійснюється безпосередньо в тканинах та рідинах організму у відповідь на зміну балансу між швидкістю утворення та утилізації іонів водню /8, 9/. Отримані результати піддавали статистичній обробці з використанням методів варіаційної статистики Стьюдента.

При моделюванні у білих щурів компенсованого метаболічного ацидозу та алкалозу протягом 5 місяців показники кислотно-основного стану крові (рН, рСО<sub>2</sub> та НСО<sub>3</sub>) в окремі терміни не відповідають зрушенням, що відтворюються.

Вміст щурів на раціоні з надлишком амонію викликає у них розвиток явищ компенсованого метаболічного ацидозу, що виражається достовірним зниженням у крові тварин рН, вмісту вуглекислоти та бікарбонатів (табл. 1).

Порівняно з контролем при моделюванні метаболічного ацидозу рН крові у щурів достовірно знижується до 7.3 од. до кінця місяця та до 7.2 од. через 2 місяці з початку експерименту (табл. 1).

Надлишок у раціоні білих щурів іонів амонію пов'язує  $\alpha$ -кетоглутарат циклу трикарбонових кислот, призводить до зниження його функціонування та накопичення недоокислених продуктів з розвитком явищ метаболічного ацидозу /21/.

Однак через 5 місяців від початку моделювання метаболічного ацидозу рН крові у піддослідних щурів підвищується до 7.44 од. (табл. 1).

Причиною цього факту є значне зниження вмісту у тканинах структурних ліпідів при прискореному окисленні жирних кислот, у процесі якого додатково підвищується концентрація іонів водню, що формує явища метаболічного ацидозу.

Зі збільшенням тривалості моделювання у щурів метаболічного ацидозу спостерігають явища вторинного алкалозу, що свідчить про виснаження і, відповідно, зниження витрат тканинних ліпідів в окислювальних процесах, в результаті яких виробляються іони водню /22/.

При моделюванні метаболічного алкалозу надлишком у раціоні тварин бікарбонату натрію рН крові у білих щурів на відміну від моделювання ацидозу достовірно зростає, починаючи з третього дня, протягом першого тижня проведення експерименту (табл. 1). Через тиждень від початку моделювання метаболічного алкалозу протягом усього експерименту відзначають достовірне зниження рН крові щурів у порівнянні з контролем (табл. 1), що свідчить про розвиток вторинного метаболічного ацидозу на фоні первинного метаболічного алкалозу.

Встановлені явища знайшли своє пояснення щодо особливостей регуляції метаболічної системи кислотно-основного гомеостазу. Розвиток явищ вторинного метаболічного ацидозу при моделюванні метаболічного алкалозу відбувається внаслідок надмірного компенсаторного утворення органічних кислот у гліколізі та трикарбонатовому циклі для підтримки рН /23, 24, 25/.

Моделювання метаболічного ацидозу супроводжується з перших днів поступовим достовірним зменшенням вмісту вуглекислоти в крові щурів, що досягає до 2 місяців максимального зниження вмісту вуглекислоти (більш ніж у 2 рази) (табл. 2). Однак через 5 місяців моделювання ацидозу рівень вуглекислоти дещо збільшується порівняно з попередніми термінами дослідження, залишаючись достовірно нижчим за контрольні значення.

При моделюванні метаболічного алкалозу спостерігають достовірне збільшення (в 1,5 рази) вмісту вуглекислоти в крові піддослідних щурів протягом перших двох тижнів та зниження цього показника у 2 рази до двомісячного терміну проведення експерименту порівняно з контролем, що пов'язано з розвитком явищ вторинного ацидозу (табл. 2). Через 5 місяців моделювання алкалозу рівень вмісту вуглекислоти не відрізняється від контролю (табл. 2), що відбиває виснаження компенсаторних механізмів.

Динаміка зміни вмісту бікарбонатів у крові щурів повторює зміни вмісту вуглекислоти. При моделюванні метаболічного ацидозу відзначають достовірне поступове зниження вмісту бікарбонатів з найнижчими показниками через 2 місяці від початку експерименту, тоді як при моделюванні алкалозу протягом перших двох тижнів вміст бікарбонатів значно збільшується.

Показники рН крові білих щурів під час моделювання  
 метаболічного ацидозу та алкалозу (од.)

Термін дослідження	Контроль	Метаболічний ацидоз	Метаболічний алкалоз
3 доби	7,37±0,01	7,35±0,02	*7,61±0,01 <sup>o</sup>
1 тиждень	7,37±0,01	7,34±0,02	*7,45±0,01** <sup>o</sup>
2 тижня	7,38±0,01	7,33±0,02	*7,33±0,01**
1 місяць	7,37±0,01	*7,30±0,02	*7,25±0,01**
2 місяця	7,38±0,01	*7,20±0,01**	*7,20±0,01**
5 місяців	7,38±0,01	*7,44±0,02**	*7,31±0,01** <sup>o</sup>



Таблиця 2

Вміст вуглекислоти (рСО<sub>2</sub> мм рт. ст.) у крові білих щурів при моделюванні метаболічного ацидозу та алкалозу

Термін дослідження	Контроль	Метаболічний ацидоз	Метаболічний алкалоз
3 доби	40,65±0,62	38,90±0,76	*59,95±1,43 <sup>o</sup>
1 тиждень	39,40±0,75	*33,75±0,80**	*57,50±0,95 <sup>o</sup>
2 тижня	39,55±0,63	*30,05±1,16	*61,35±2,05 <sup>o</sup>
1 місяць	39,85±0,65	*22,25±0,78**	*24,45±0,71**
2 місяця	39,55±0,67	*18,40±0,82**	*14,50±0,96**
5 місяців	39,30±0,95	*27,60±1,21**	37,45±1,11 <sup>**o</sup>

Примітка. Знак «\*» позначає достовірні відмінності дослідних груп щурів у порівнянні з контролем, знак «\*\*» означає достовірну відмінність від попередньої дослідної групи щурів, знак «<sup>o</sup>» відзначає достовірну відмінність показників при моделюванні алкалозу порівняно з ацидозом ( $P \leq 0,001-0,05$ ).

До місячного та двомісячного термінів моделювання ацидозу та алкалозу вміст бікарбонатів у крові щурів знижується до однакового рівня, дещо збільшуючись до 5-ти місячного терміну проведення експериментів (табл. 3).

Таблиця 3

Вміст бікарбонату ( $\text{HCO}_3$ -ммекв/мл) у крові білих щурів при моделюванні метаболічного ацидозу та алкалозу

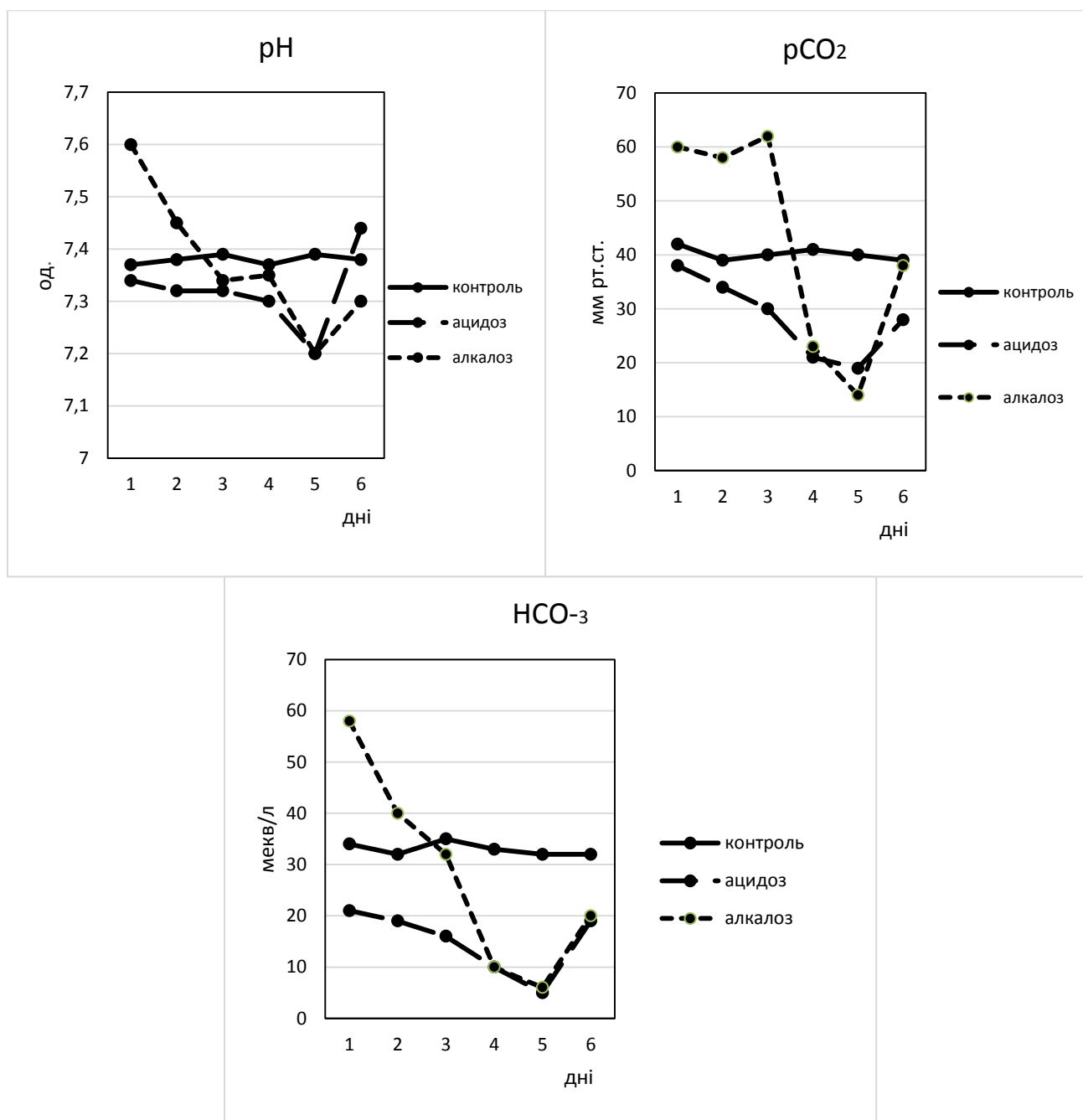
Термін дослідження	Контроль	Метаболічний ацидоз	Метаболічний алкалоз
3 доби	23,25±0,29	*20,95±0,79	*56,85±0,89 <sup>o</sup>
1 тиждень	22,55±0,49	*18,55±0,88	*40,00±1,62** <sup>o</sup>
2 тижня	23,60±0,36	*16,15±0,91	*32,60±1,12** <sup>o</sup>
1 місяць	23,42±0,26	*10,95±0,30**	*10,15±0,49**
2 місяця	22,65±0,42	* 5,05±0,46**	*5,65±0,29**
5 місяців	22,20±0,55	*18,75±1,05**	*18,85±0,81**

Примітка. Знак «\*» позначає достовірні відмінності дослідних груп щурів у порівнянні з контролем, знак «\*\*» означає достовірну відмінність від попередньої дослідної групи щурів, знак «<sup>o</sup>» відзначає достовірну відмінність показників при моделюванні алкалозу порівняно з ацидозом ( $P \leq 0,001- 0,05$ ).

Для наочності дані таблиць представлені у вигляді графіків на мал.1, з яких видно однакове зниження рН крові вже на 3 добу при моделюванні у щурів метаболічного ацидозу та алкалозу. Через 5 місяців при моделюванні метаболічного алкалозу знаходять достовірно нижчі показники рН крові порівняно з моделюванням метаболічного ацидозу.

Високий вміст вуглекислоти в крові щурів протягом перших двох тижнів моделювання метаболічного алкалозу різко знижується через 2 тижні до контрольних значень, а через місяць - до рівня, що спостерігається під час моделювання метаболічного ацидозу. До 5-ти місячного терміну моделювання алкалозу вміст вуглекислоти підвищується до контрольних значень. При моделюванні метаболічного ацидозу вміст вуглекислоти у крові щурів поступово знижується, достовірно підвищуючись до 5-ти місячного терміну проведення експерименту.

Вміст бікарбонатів крові при моделюванні у щурів метаболічного алкалозу та ацидозу змінюються однаково з показниками вмісту вуглекислоти. Високий вміст бікарбонату в крові щурів протягом перших тижнів моделювання алкалозу різко знижується на місяць від початку експерименту до рівня показників, що спостерігаються при ацидозі.



Мал. 1. Показники кислотно-основного стану крові білих щурів при моделюванні метаболічного ацидозу та алкалозу через 3 дні (1), 1 тиждень (2), 2 тижні (3), 1 місяць (4), 2 місяці (5) та 5 місяців (6).

При моделюванні метаболічного алкалозу через тиждень і майже до кінця експерименту визначають у щурів компенсований метаболічний ацидоз. Навпаки, через 5 місяців від початку

моделювання метаболічного ацидозу діагностують компенсований респіраторний алкалоз (табл. 4).

Таблиця 4.

Кислотно-основний стан крові білих щурів  
при моделюванні метаболічного ацидозу та алкалозу

Термін дослідження	Моделювання метаболічного ацидозу	Моделювання метаболічного <i>алкалозу</i>
3 доби	<b>Норма</b>	Частково компенсований метаболічний <b><i>алкалоз</i></b>
1 тиждень	Частково компенсований метаболічний <b>ацидоз</b>	Частково компенсований метаболічний <b><i>алкалоз</i></b>
2 тижня	Частково компенсований метаболічний <b>ацидоз</b>	Частково компенсований респіраторний <b>ацидоз</b>
1 місяць	Частково компенсований метаболічний <b>ацидоз</b>	Частково компенсований метаболічний <b>ацидоз</b>
2 місяця	Частково компенсований метаболічний <b>ацидоз</b>	Частково компенсований метаболічний <b>ацидоз</b>
5 місяців	Частково компенсований респіраторний <b><i>алкалоз</i></b>	Метаболічний + респіраторний <b>ацидоз</b>

Використання лабораторних показників для діагностики кислотно-основного стану традиційним методом, що визначається за допомогою спеціальних автоматичних газоаналізаторів, аналогічно використанню електрокардіограми для діагностики інфаркту міокарда. Однак ні зміни електрокардіограми, ні порушення електропровідності, відображені цими змінами, ніколи не вважалися причиною інфаркту міокарда. У той час як для показників крові передбачається, що зрушення концентрації  $\text{HCO}_3^-$  (бікарбонату), наприклад, відповідають за наявність метаболічного ацидозу або алкалозу у всіх тканинах і рідинах організму. Як показали наші дослідження з моделювання метаболічного ацидозу або алкалозу у щурів, при визначенні кислотно-основного стану крові по рН, вмісту вуглекислого газу і бікарбонату вдається отримати прямо протилежні результати, що ставить під сумнів можливість використання загальноприйнятого методу визначення кислотно-основного стану. У пізні терміни моделювання метаболічного алкалозу тільки в перші дні експерименту визначають явища алкалозу, які швидко змінюються явищами вторинного метаболічного і респіраторного ацидозу. Розвиток гіперкомпенсованого надмірного утворення органічних кислот в тканинах призводить до накопичення іонів водню і відновлення внутрішнього середовища, як наслідок, розвитку явищ вторинного метаболічного ацидозу, тоді як при моделюванні алкалозу характерні інші порушення обміну речовин. Газоаналізатор формально реєструє відповідні метаболічному ацидозу параметри крові (рН,  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), який розвивається як компенсаторний стан метаболічного алкалозу, що виник під впливом відповідної дієти - екзогенного фактора ризику. Діагностування явищ

вторинного ацидозу при первинному метаболічному алкалозі вносить істотну похибку як в розуміння патогенезу захворювань, так і в проведенне лікування.

При важкому або тривалому ацидозі загальноприйнятим методом діагностується метаболічний алкалоз, так як інтенсивне окислення жирних кислот, що формує і підтримує явища метаболічного ацидозу, призводить до значного зниження загального вмісту наявних ліпідів в тканинах і рідинах організму, що в свою чергу призводить до зменшення кількості іонів водню в навколишньому середовищі і відповідно, діагностується газоаналізатором як метаболічний алкалоз.

Таким чином, визначення КОС загальноприйнятим методом, за допомогою газоаналізатора, не виявляє первинних порушень кислотно-основного балансу в крові при досить тривалому перебігу компенсаторних реакцій і може не точно відображати стан кислотно-основного гомеостазу, що розвивається в організмі з плином часу.

Деякі дослідники, щоб уточнити стан КОС, враховують показники основного іонного складу в крові - натрію, калію, кальцію, магнію та ін., тісно пов'язуючи зміни іонного складу організму, його споживаних запасів корисних резервів і стан показників КОС /26/. Також подальшого вивчення вимагає витрати основних запасів білків, ліпідів, вуглеводів, нуклеїнових кислот, вітамінів та інших класів органічних молекул, на основні шляхи обміну речовин в організмі для корекції і компенсації тривалих порушень кислотно-основного гомеостазу і підтримки сталості внутрішнього середовища. Підвищене використання мінеральних компонентів, а також основних запасів біоорганічних речовин з метою підтримки сталості внутрішньоклітинного середовища

може з часом і при тривалому впливі факторів ризику привести до виснаження основних запасів і без належного своєчасного поповнення витрачених ресурсів сприяти розвитку патологічних станів організму.

Так, згідно з проведеною нами літературою і незалежними дослідженнями, при кардіоміопатії, ішемічної хвороби серця, колагенозі, гепатиті, остеохондрозі, що розвиваються на тлі компенсованого метаболічного алкалозу, визначення явищ метаболічного ацидозу загально визнаним методом вносить істотну похибку /27, 28, 29-32/. Наприклад, встановлене окислення рідини порожнини рота при карієсі є результатом методологічної помилки у визначенні кислотно-основного стану.

На протязі тривалого часу, крім трьох основних систем підтримки кислотно-основного гомеостазу в організмі людини і тварин (дихальної, видільної і буферної), досліджувалась четверта система - метаболічна /7, 8, 9, 10, 11, 12, 13/. Дана система являє собою сукупність альтернативних змін напрямку і інтенсивності метаболізму вуглеводів, ліпідів, білків і нуклеїнових кислот, які відбуваються безпосередньо в клітинах при порушенні КОС в організмі.

Фізіологічне значення цих змін обміну речовин полягає в регулюванні інтенсивності взаємоперетворень сильних органічних кислот і основ в більш слабкі кислоти і основи або нейтральні сполуки і навпаки.

З'ясовано, що на ранніх стадіях змін КОС, крім буферної системи, для забезпечення сталості внутрішньоклітинного рН включаються гомеостатичні молекулярні механізми тканин, спрямовані на зв'язування надлишків протонів при ацидозі і утворення органічних



кислот при дефіциті протонів при алкалозі, так звану метаболічну регуляторну систему /7, 8, 9, 10, 11, 12, 13/.

Як показали наші подальші дослідження, неоднозначні результати визначення кислотно-основного стану в явищах метаболічного ацидозу або алкалозу пояснюються особливостями функціонування метаболічної системи регуляції кислотно-основного гомеостазу, а також виснаженням біохімічних, респіраторних і видільних компенсаторів /27-32, 33, 34, 35, 36, 37/.

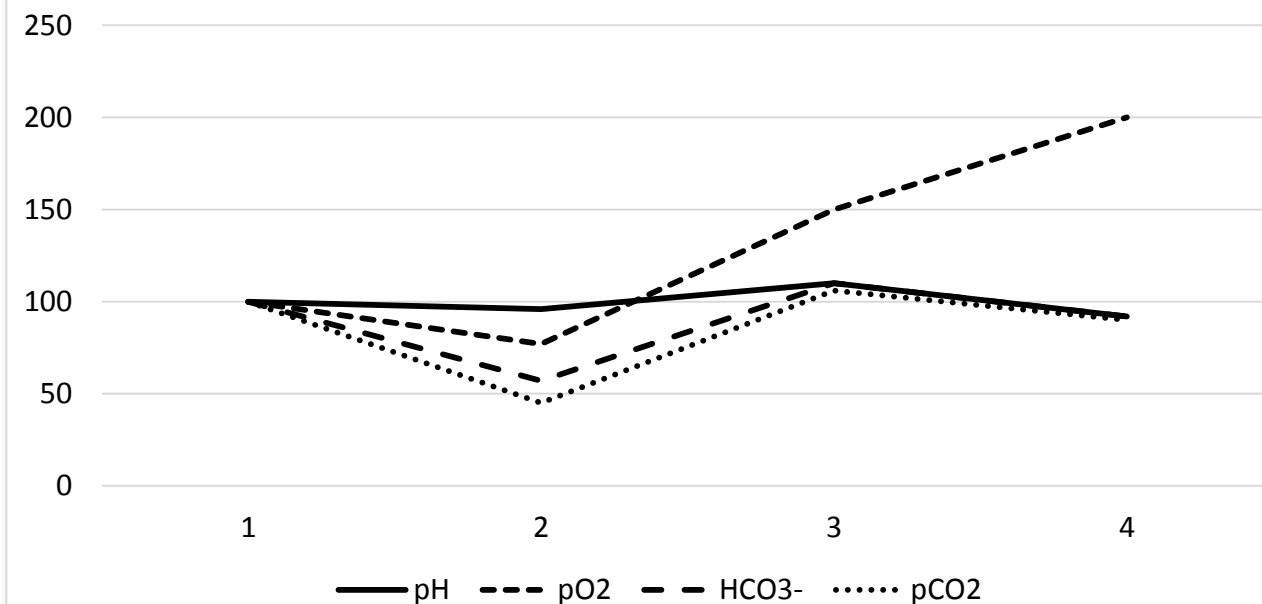
Однак вивчення біохімічними методами великої кількості показників, що відображають особливості протікання компенсаторних процесів в організмі, дорогі, трудомісткі і тривалі у виконанні /37, 38/. Для своєчасної корекції зрушень в клініці необхідні експрес-методи, тому був запропонований і запатентований метод за допомогою черезшкірного моніторингу парціального тиску кисню ( $pO_2$ ) в крові /39/.

Винахід було засновано на завданні вдосконалення методу визначення зрушень кислотно-основного стану в біологічних тканинах і рідинах шляхом додаткових біохімічних досліджень при визначенні парціального тиску кисню в крові, що дозволить підвищити надійність і прискорити час дослідження. Крім біохімічних аналізів крові, визначається парціальний тиск кисню крові і при його значеннях вище норми з'ясовується наявність зрушень КОС (рис. 2). Метод виконується наступним чином: визначення в крові парціального тиску кисню ( $pO_2$ ) проводиться або безпосередньо в крові, взятої у людини або тварини, або за допомогою черезшкірного моніторингу  $pO_2$  в капілярному кровотоці тканин організму. Суть запропонованого винаходу полягає в

тому, що здатність гемоглобіну крові зв'язувати кисень безпосередньо залежить від вмісту в середовищі вуглекислого газу і гідрокарбонатів, зміни вмісту яких відзначаються вже на ранніх стадіях зрушень кислотно-основного стану /39/.

Парціальний тиск в крові кисню безпосередньо залежить від зміни вмісту вуглекислого газу і гідрокарбонатів при явищах метаболічного ацидозу або алкалозу. У разі розвитку вторинних ацидозних явищ на тлі метаболічного алкалозу, як це найчастіше буває при надмірному функціонуванні компенсаторних механізмів, зниження вмісту вуглекислого газу і гідрокарбонатів крові не відбивається і не дозволяє діагностувати первинний алкалоз, що має велике значення для розуміння патогенезу лікування.

**Мал. 2. Показники кислотно-основного стану в крові щурів при моделюванні метаболічного ацидозу та алкалозу через 1 день та первинного метаболічного алкалозу з вторинним метаболічним ацидозом через 1 місяць (% до контролю)**



Тільки подальше підвищення  $pO_2$  в крові (мал. 2) виявляє прогресування алкалозу в організмі досліджуваних біологічних об'єктів /39/.

Цей метод здійснюється при компенсованих і декомпенсованих зрушеннях КОС шляхом реєстрації парціального тиску кисню крові за допомогою безпосереднього вимірювання в крові або через вимірювання через шкіру. Таким чином, в порівнянні із загальноприйнятим методом, заявлений метод визначення зрушень кислотно-основного стану дозволяє з високим ступенем ймовірності в більш короткі терміни визначити наявність первинного метаболічного алкалозу або ацидозу /39/.

Отримані дані і узагальнення дають підстави для розробки ряду рекомендацій практичного характеру, важливих для профілактичної та практичної медицини.

## РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СИСТЕМИ ОБМІНУ РЕЧОВИН ДЛЯ ПІДТРИМКИ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО ГОМЕОСТАЗУ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

Кисотно-основний стан організму можна більш точно оцінити за набором біохімічних показників, що відображають компенсаторні механізми, спрямовані на зв'язування надлишку іонів водню при метаболічному ацидозі і прискорене утворення органічних кислот для підтримки рН при алкалозі /37/.

Компенсований метаболічний ацидоз або алкалоз складно визначити за допомогою загальноприйнятого методу за показниками крові (рН,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{pCO}_2$ ), так як ці показники відображають, в першу чергу, компенсаторні зміни в дихальній і видільній системах. Крім того, при явищах гіперкомпенсації метаболічного алкалозу при надмірному утворенні органічних кислот визначаються явища метаболічного ацидозу. У зв'язку з цим в даній роботі про зрушення в кислотно-лужному стані судили не лише за показниками рН,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{pCO}_2$  в крові, але й по компенсаторним механізмам так званої метаболічної системи регуляції кислотно-основного гомеостазу, здійснюваної безпосередньо в тканинах і рідинах організму у відповідь на зміну балансу між швидкістю утворення і утилізацією іонів водню.

## **2.1. ВИВЧЕННЯ ОКИСЛЮВАЛЬНО-ВІДНОВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТКАНИН ТА РІДИН ОРГАНІЗМУ**

Окислювально-відновні властивості в тканинах і рідинах організму є основним регулятором напрямку обмінних процесів: діабетоподібна орієнтація при метаболічному ацидозі і окислювальний стрес при метаболічному алкалозі. Про окислювально-відновні властивості судять за вмістом і співвідношенням тіолів і дисульфідів, окислених і відновлених нікотинамідних коферментів і флавінових нуклеотидів /41, 42/.

### ***2.1.1. Колориметричний метод визначення SH-груп і SS-зв'язків у білках і низькомолекулярних сполуках з використанням 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної) кислоти – ДТНБК***

Тіол-дисульфідна система - потужне депо в тканинах організму, що зв'язує або вивільняє іони водню при зрушеннях в кислотнo-лужному стані - грає важливу роль в підтримці окислювально-відновного стану організму.

**Принцип методу:** Взаємодія ДТНБК (5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної) кислоти) з вільними SH-групами білків відбувається в реакції, що протікає при рН = 8,0, в результаті чого відбувається вивільнення тіонітрофенілового аніону (TNFA) /43, 44/. Кількість утвореного TNFA прямо пропорційно кількості вільних SH-груп білків, що вступають в реакцію з ДТНБК. Коефіцієнт молярного поглинання TNFA при 412 нм становить 11400 /45/.

**Реактиви:**

1. 0,1 М калієво-натрієво-фосфатний буфер, рН 8,1 -  
1,13 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 7,5 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , розчинити в 500 мл дистильованої води;
2. 0,1 N HCl - 8,33 мл конц. HCl в 1 л дистильованої води;
3. 0,1 N NaOH - 4 г в 1 л дистильованої води;
4. Реактив Еллмана /ДТНБК/ -  
40 мг ДТНБК розчинити в 10 мл фосфатного буфера рН 8,10,05 М,  
(ex tempore);
5. 0,05 М калій-натрій фосфатний буфер рН 8,1 -  
0,57 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 3,75 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , розчинити в 500 мл води.

Реагенти і буфери зберігаються в холодильнику.

**Підготовка досліджуваних проб:**

Для приготування гомогенату (тканини печінки, нирок, серцевого м'яза, слинних залоз, слизової, кісткової і м'язової тканини) 50-60 мг тканини натирають в порцеляновій ступці зі скляним піском, додають 1 мл 0,1 М Тріс буфера рН 7,5 і центрифугують при 1500 об/хв. 15 хвилин. Зазвичай для роботи необхідно 3-4 мл супернатанту.

Для відділення плазми від еритроцитів гепаринізованої крові (шприц для забору крові промивають розчином гепарину) кров центрифугують при 1500 об/хв, 15 хвилин - не більше, так як з більшою швидкістю деякі ферменти (наприклад, фермент гексокіназа) випадають в осад.

Гемолізат еритроцитів отримують шляхом розчинення 0,1 мл густоцентризованих при 3000 об/хв, 15 хвилин (двічі промивають

фізіологічним розчином еритроцитів) в 1 мл дистильованої води (розведення 1:10).

**Хід дослідження:**

***А. Визначення SH - груп білків і низькомолекулярних сполук;***

1. 0,1 М калій-натрій фосфатний буфер рН 8,1- 2,5 мл;
2. Реактив Еллмана - 0,2 мл;
3. Досліджуваний зразок - 0,1 мл супернатанту тканинного гомогенату, плазми або сироватки крові, 1 мл гемолізату еритроцитів.

Зразки змішують, струшують. Через 10 хвилин знімають показання на спектрофотометрі ( $E_1$ ) на довжині хвилі 410 нм (лампа розжарювання), попередньо доводять нульовий контроль до реагентів. Кожен зразок піддається своєму окремому контролю - 0,1 мл гомогенату, плазми або сироватки, 1 мл гемолізату еритроцитів в 3 мл фосфатного буфера.

***Б. Визначення SS-зв'язків білків і низькомолекулярних сполук.***

Продовжуємо визначати SS-зв'язки білків і низькомолекулярних сполук після їх відновлення шляхом додавання тих же пробірок з попередніми зразками після визначення SH-груп білків від 2,5 мл 0,1 N NaOH до рН зразка, рівного 10,5.

Після цього через 2 хвилини під контролем секундоміра в кожную пробу вливається 2,5 мл 0,1 N HCl.

Зняти показання на спектрофотометрі, визначивши другий показник ( $E_2$ ) і знайти різницю між показаннями вимірювання ( $E_2 - E_1$ ).

Розрахунок вмісту SH-груп білків і низькомолекулярних сполук:

$$\underline{E_1 * 3}$$

**11,4 \* n, мкмоль/г ткани или мкмоль/мл.**

Розрахунок вмісту SS-зв'язків в білках і сполуках малих молекул:

$$\underline{(E_2 - E_1) * 3}$$

**11,4 \* n, в мкмоль/г тк или мкмоль/мл.**

де 3 – обсяг кювети (мл);

11,4 – коефіцієнт мкмольного поглинання ТНФА;

n – розведення.

### ***2.1.2. Визначення вмісту окислених і відновлених нікотинамідних коферментів***

**Принцип методу** заснований на тому, що фермент ізоцитрат-дегідрогеназа каталізує перетворення ізолімонової кислоти в  $\alpha$ -кетоглутарову кислоту з одночасним перенесенням окисленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD) в відновлену форму (NADH). Зміст NADH визначали за величиною оптичної щільності на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм /46/.

#### **Реактиви:**

1. 0,1 М трис-НСІ буферного рН 7,5 - 6,05 г трис-НСІ розчинити в дистильованій воді, довести рН до 7,5 на рН-метр і довести об'єм у вимірювальній колбі;

2. 50% етанолу, приготованого шляхом розведення 96% етанолу дистильованою водою;



3. 0,1 М розчину хлориду магнію - 9,52 г хлориду магнію розчинити в 100 мл дистильованої води в мірній колбі;

4. Готується 0,02 М розчин цитрату натрію (*ex tempore*) шляхом розчинення 3,16 г цитрату натрію в 200 мл трис-буфера рН 7,5 в мірній колбі;

5. Ізоцитратдегідрогеназа (ІЦДГ) - готується шляхом розведення потрібної кількості (0,1-0,4 мл) дистильованої води в пропорції 1: 10 (*ex tempore*).

Всі реагенти зберігаються в холодильнику.

#### **Підготовка досліджуваних проб:**

У центрифужні пробірки додають 0,5 мл 50% етанолу і 0,5 мл досліджуваного зразка - супранірований тканинний гомогенат, плазму або сироватку, гемолізат еритроцитів - центрифугований 10 хв при 2500 об / хв, в дослідження береться супернатант.

#### **А. Хід визначення відновлених нікотинамідних коферментів;**

1. 0,1 М трис-НСІ буфер рН 7,5 - 2,5 мл;
2. 0,1 М хлориду магнію - 0,1 мл;
3. 0,02 М цитрату натрію - 0,2 мл;
4. досліджувана проба - 0,2 мл;

Визначте показання на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм, при нульовому виході проти дистильованої води. За вказівкою на перше згасання ( $E_1$ ) визначається вміст відновлених коферментів нікотинаміду (NADH) в пробі.

#### **Б. Хід визначення окислених нікотинамідних коферментів;**

Ставлять на попередню інкубацію при температурі 37°C в водний термостат на 10 хвилин. Тим же зразкам, в яких було визначено вміст

відновлених коферментів, визначають 0,1 мл розведеної (1:10) ізоцитратдегідрогенази, проби продовжують перебувати в термостаті.

Виміряйте збільшення згасання до тих пір, поки показання не стабілізуються кожні 10 хвилин ( $E_2$ ,  $E_3$  і т.д.). Різниця між останнім показанням до стабілізації і першим відповідає вмісту окислених коферментів.

Розрахунок вмісту відновлених нікотинамідних коферментів (NADH):

$$\underline{E_1 * 3}$$

$$6,22 * n, \text{ мкмоль/г тканини або мкмоль/мл.}$$

$$\underline{(E_2 \text{ або } E_3 - E_1) * 3}$$

$$6,22 * n, \quad \text{в мкмоль/г тканини або мкмоль/мл.}$$

где 3 – обсяг кювети (мл);

6,22 – коефіцієнт молярного поглинання 1 мкмоль відновленого коферменту (NADH);

n – розведення.

## **2.2. ВИЗНАЧЕННЯ ДІАБЕТОПОДІБНОГО НАПРЯМКУ ОБМІННИХ ПРОЦЕСІВ ТА ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ**

Про спрямованість обмінних процесів судили по активності ключових ферментів гліколізу (піруваткінази або фосфофруктокінази) (КФ 2.7.1.40 та КФ 2.7.1.11) і глюконеогенезу (фруктозадифосфатаза) (КФ 4.1.2.13), циклу трикарбонових кислот (НАД- та НАДФ-залежних

ізоцитратдегідрогенази і малатдегідрогенази) (КФ 1.1.1.41 та КФ 1.1.1.37).

При метаболічному ацидозі спостерігається діабетоподібна спрямованість обмінних процесів, яка характеризується зниженням функціонування гліколізу і циклу трикарбонових кислот і компенсаторним прискоренням процесів глюконеогенезу, спрямованих на зв'язування надлишкових іонів водню / 7-13 /.

При метаболічному алкалозі, навпаки, спостерігається підвищене утворення органічних кислот при гліколізі і циклі трикарбонових кислот, спрямованих на компенсаторне зростання відновлених сполук в триклітинному середовищі, і пригнічення реакцій глюконеогенезу, що характерно для оксидативного стресу / 7-13 /.

### ***2.2.1. Визначення активності ключового ферменту глюконеогенезу – фруктозидифосфатази***

**Принцип методу:** полягає у визначенні зростання неорганічного фосфату (НФ) в інкубаційному середовищі при відщепленні останнього від субстрату в присутності ферменту /47/.

Для остаточного визначення - визначення неорганічного фосфату - був обраний метод Лесосо J. та Inesi G., який дозволяє визначити НФ в присутності АТФ, що важливо при роботі з біологічними тканинами і рідинами, які містять достатню кількість АТФ /48/. Метод заснований на утворенні жовтого фосфорномолібденованатного комплексу.

**Реактиви:**

1. Трис-НСІ буфер 0,05 М рН 7,5 - 3,025 г трис-НСІ розчинити у дистильованій воді, доводять НСІ до потрібного рН і доливають дистильовану воду до 500 мл в мірну колбу;

2. Фруктоза-1,6-дифосфат 0,03 М - 391 мг барієвої солі фруктоза-1,6-дифосфат розчинити в 2 мл дистильованої води. Отриману суміш розчиняють 1-2 краплями концентрованого НСІ. Потім по краплях в розчин додають 10% розчин сульфату натрію ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). При появі помутніння опади повторюються. Коли осадження завершиться, розчин центрифугують при 1500 об/хв 10 хвилин, центрифугат переносять у колбу об'ємом 25 мл, доводять до рН 7,70 3% NaOH і доливають дистильованою водою до позначки.

3. 30% трихлороцтову кислоту (ТХО) готують з насиченого розчину ТХО - 52,5 мл доводять дистильованою водою до 200 мл.

4. Реагент № 1 - 100 г модібдату амонію розчиняють при нагріванні, після розчинення додають 10 мл 25% аміаку і доводять обсяг дистильованої води до 1 л.

5. Реагент № 2 - 2,35 г ванадату амонію розчиняють в 400 мл дистильованої води при нагріванні, потім розчин охолоджують, додають суміш з 14 мл дистильованої води і 6,16 мл концентрованого  $\text{HNO}_3$  і доводять обсяг дистильованої води до 1 л.

6. Реагент № 3 - 500 мл 30% ТХО змішують з 100 мл реактиву № 1 і 100 мл реагенту № 2 комплексу.

**Хід визначення:**

Інкубаційна суміш для визначення активності ФдФази:

1. Трис-НСІ буфер 0,05 М рН 7,5 - 1,3 мл.

2. фруктоза-1,6-дифосфат - 0,1 мл,

3. досліджувана проба - 0,1 мл,

Попередню інкубацію проводять в термостаті протягом 15 хвилин при температурі 37°C. Потім реакцію припиняють, додаючи 1,5 мл реактиву N 3.

Для кожного досліджуваного зразка проводиться контроль для визначення початкового вмісту фосфору в тестах. Контрольні проби містять 1,4 мл трис-буфера і 0,1 мл випробуваної проби, без інкубації в кожену пробу додають по 1,5 мл реактиву № 3.

Всі зразки центрифугуються протягом 15 хв при 2000 об/хв і вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 350 нм проти проби, що містить 1,5 мл дистильованої води і 1,5 мл реактиву N 3.

Вміст неорганічного фосфору (НФ) визначається за кривою, розраховується різниця в зміні НФ між експериментальними і контрольними зразками.

Активність ферменту виражається в мкмольх НФ в 1 г тканини або 1 мл випробуваного за 1 секунду.

Активність фруктозодифосфатази розраховується за формулою:

**(мкг НФ /дослідного зразка/ - мкг НФ /контрольного зразка/) \* 3,**

**900 \* 31 \*n**

де:

3 – об'єм кювети, мл

900 – кількість секунд в 15 хвилинах інкубації,

31 – кількість НФ в мкг в 1 мкмолі,

n - розведення в зразку по відношенню до 1 г або 1 мл випробовуваного.

При проведенні реакції предмет слід розбавляти так, щоб згасання зразків не перевищувало 0,500 од. шкали, так як метод чутливий при зчитуванні від 0,100 до 0,500 од. шкали спектрофотометра.

### ***2.2.2. Визначення активності ключового ферменту гліколізу - піруваткінази***

При розвитку метаболічного ацидозу спостерігається зниження активності ключових ферментів і прямих NAD-залежних реакцій гліколізу і трикарбонового циклу на тлі переважання активності ключових ферментів глюконеогенезу і зворотних реакцій гліколізу і трикарбонового циклу, що беруть участь в редукційних реакціях. При метаболічному алкалозі, навпаки, спостерігаються альтернативні зміни вуглецевого потоку: прискорення функціонування гліколізу і трівуглецевого циклу на тлі зниження характерних для окисного стресу процесів глюконеогенезу.

**Принцип методу** полягає у визначенні відновлення вмісту NADH в інкубаційному середовищі при одночасному відновленні пірувату в реакції лактатдегідрогенази /49/.

#### **Реактиви:**

1. 0,05 М трис-НСl рН 7,6 - 25 г трис-НСl розчинити в 500 мл дистильованої води;

2. 0,3 % М ацетату магнію – розчинити 150 мг ацетату магнію в 50 мл дистильованої води;
3. 0,5% хлористого калію - 250 мг розчинити в 50 мл дистильованої води;
4. Нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений (NADH) - 3 мг в 1 мл дистильованої води, приготовлений *ex tempore*;
5. Аденозиндифосфат (АДФ), 0,004 М – 4 мг в 1 мл дистильованої води, приготовлений *ex tempore*;
6. Фосфоенолпіруват (ФЕП) - 10 мг в 1 мл дистильованої води, приготовленої *ex tempore*;
7. Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) – 0,1 мл основного ферменту ЛДГ розчиняється *ex tempore* в 1,0 мл дистильованої води (1:10). ЛДГ зберігається в замороженому стані.

**Хід дослідження:**

1. Буфер Трис-НСІ – 2,5 мл,
2. НАДН – 0,05 мл,
3. хлористий калій - 0,1 мл,
4. ацетат магнію – 0,1 мл,
5. АДФ – 0,1 мл,
6. ЛДГ – 0,1 мл,
7. досліджувана проба - 0,1 мл.

Після струшування зразки поміщають для попередньої інкубації в термостат при температурі 37°C на 1 годину для встановлення ферментативної рівноваги в реакційному середовищі. Через 1 годину

вимірюють перший показник ( $E_1$ ) на СФ при 340 нм проти дистильованої води, потім починають реакцію піруваткінази додаванням 0,1 мл розчину ФЕП, проби струшують і поміщають в термостат для інкубації на 1 годину, після інкубації відразу вимірюють друге показання ( $E_2$ ). Отримана різниця показників ( $E_1 - E_2$ ) використовується у формулі для розрахунку активності піруваткінази.

Формула розрахунку активності піруваткінази:

$$\frac{\Delta E * 3}{6,22 * 3600 * n},$$

мкмоль/сек на 1 г тканини або в 1 мл проби,

де:

$\Delta E$  - різниця в вимірюваннях між  $E_1$  і  $E_2$ ;

6,22 - оптична щільність 1 мкмоль НАДН;

3 - обсяг кювети в мл;

3600 – час інкубації в секундах;

n – розведення проби відносно 1 г або 1 мл.

### ***2.2.3. Визначення активності НАД- та НАДФ-залежних ізоцитратдегідрогенази та малатдегідрогенази - ключових ферментів трикарбонового циклу***

З проведеними дослідженнями розвиток метаболічного ацидозу характеризує зниження активності гліколізу, трикарбонового циклу та біосинтезу жирних кислот, амінокислот та нуклеотидів та, відповідно, ліпідів, білків та нуклеїнових кислот при прискореному утворенні глюкози та полісахаридів, що викликає у тканини надмірне



накопичення останніх. При метаболічному алкалозі, навпаки, знижене утворення полісахаридів при їх прискореному окисленні лежить в основі розвитку патології сполучної тканини.

**Принцип методу** полягає у визначенні збільшення вмісту NADH або NADPH при окисленні субстратів у ізоцитрат- та малатдегідрогеназних реакціях /50/.

### **Реактиви:**

1. трис-НСl буфер 0,1 М рН 7,6 - 12,1 г трис-НСl розчинити в 1 л дистильованої води;
2. магній хлористий 0,1 М - 17,5 мл насиченого розчину довести до 100 мл дистильованою водою;
3. НАД або НАДФ - 4 мг розчиняють у 1 мл дистильованої води, готують *ex tempore*;
4. 0,14 М натрій яблучнокислий, для визначення малатдегідрогенази - 525 мг розчиняють у 25 мл дистильованої води;
5. 0,02 М натрій лимоннокислий, для визначення ізоцитратдегідрогенази - 125 мг розчиняють у 25 мл дистильованої води.

### **Хід визначення:**

1. трис-НСl буфер 0,1 М - 2,5 мл,
2. магній хлористий - 0,1 мл,
3. НАД або НАДФ – 0,2 мл,
4. досліджувана проба – 0,25 мл.

Пробірки струшують і поміщають проби в термостат на 30 хв при 37°C для встановлення ферментативного рівноваги в інкубаційному середовищі /50/. Після інкубації знімають на спектрофотометрі першу екстинкцію ( $E_1$ ) при 340 нм (лампа розжарювання) проти дистильованої води. Після чого проби вносять для визначення активності малатдегідрогенази по 0,25 мл натрію яблучнокислого або для визначення активності ізоцитратдегідрогенази по 0,25 мл натрію лимоннокислого, проби струшують і поміщають для інкубації в термостат на 30 хвилин. Після інкубації знімають друге показання екстинкцій проб ( $E_2$ ) на спектрофотометрі та знаходять різницю екстинцій ( $E_2 - E_1$ ).

Формула розрахунку активності ферментів:

$$\Delta E * 3$$

$$6,22 * 1800 * n, \text{ мкмоль/с в 1 г тканини або 1 мл досліджуваної проби}$$

де:

$\Delta E$  – різниця екстинкцій;

6,22 - оптична щільність 1 мкмоль НАДН або НАДФН,

3 - об'єм кювети у мл,

1800 - час інкубації в секундах,

n - розведення досліджуваної проби.

Деякі автори визначають активність НАД-залежної малатдегідрогенази в 0,05 М гліциновому буфері рН 10. Для приготування буфера змішують 200 мл розчину гліцину (3 г гліцину розчиняють у 200 мл дистильованої води) і 128 мл розчину NaOH (2 г мл дистильованої води) та отриманий обсяг доводять дистильованою

водою до 800 мл. Всі інші реактиви та перебіг визначення такий самий, як із трис-буфером.

## **2.3. РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ПРИ МЕТАБОЛІЧНОМУ АЦИДОЗІ ТА АЛКАЛОЗІ**

При вичерпанні компенсаторних механізмів першого і другого порядку включаються інші механізми, наприклад, посилення перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), спрямоване на підтримку окисних властивостей при явищах метаболічного ацидозу та алкалозу. Однак, фізіологічне та патологічне значення посилення ПОЛ в окисленому середовищі при метаболічному алкалозі та відновленому середовищі при метаболічному ацидозі різне. При ацидозі посилення ПОЛ організує та підтримує запальний процес у тканинах, атопічне запалення та тромбоутворення у судинному руслі. При алкалозі посилення ПОЛ сприяє окисленню ненасичених жирних кислот та прискорює процеси атеросклерозу.

### ***2.3.1. Визначення вмісту малонового діальдегіду.***

Принцип методу полягає в реагуванні малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою з утворенням пофарбованого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 532 нм /51/.

**Реактиви:**

1. Тіобарбітурова кислота 0,75 % (ТБК) – при нагріванні розчиняють 750 мг тіобарбітурової кислоти у 100 мл дистильованої води;

2. Трихлороцтова кислота 30% (ТХО) - 132 мл насиченого розчину ТХО доводять до 500 мл дистильованою водою;

**Хід визначення:**

У центрифужні пробірки з пробками вносять:

1. ТХО 30% - 1,0 мл,
2. ТБК 0,75% - 1,5мл,
3. досліджувана проба – 0,5 мл.

Пробірки з дослідними пробами поміщають у киплячу водяну баню на 30 хвилин, потім доливають 0,5 мл ТХО, центрифугують 15 хв при 2000 об/хв. Знімають показання екстинкції ( $E_1$ ) на спектрофотометрі при довжині хвилі 530 нм проти дистильованої води.

Контрольні проби містять 0,5 мл дистильованої води, 1 мл ТХО та 1,5 мл ТБК, в них визначають екстинкції ( $E_2$ ) одночасно з дослідними пробами та знаходять різницю екстинкцій ( $E_1 - E_2$ ).

Формула розрахунку вмісту малонового діальдегіду:

 **$\Delta E * 3$** 

**$156 * n$**  , мкмоль на 1 г тканини або мл досліджуваної проби.

де:

$\Delta E$  - різниця екстинкцій контрольних та дослідних проб;

$3$  - об'єм кювети у мл;

$156$  - коефіцієнт оптичної густини мкмольярного розчину ТБК;

n - розведення досліджуваного щодо 1 г або 1 мл.

### **2.3.2. Визначення активності глутатіонредуктази**

Активність глутатіонредуктази, ключового ферменту глутатіонової системи захисту від перекисних сполук, залежить від вмісту НАДРН у тканинах та рідинах організму. У разі підвищення відновлювальних властивостей середовища при метаболічному ацидозі підвищена активність ферменту підтверджує розвиток явищ ацидозу. При метаболічному алкалозі, навпаки, активність глутатіонредуктази знижується в порівнянні з контролем, у зв'язку з чим фізіологічне значення посилення активності ПОЛ по-різному при метаболічному ацидозі та алкалозі і спрямоване на регуляцію проникності мембран для іонів та інших сполук.

**Принцип методу** полягає у зниженні вмісту НАДРН у реакційному середовищі при відновленні окисленого глутатіону /52/.

#### **Реактиви:**

1. фосфатний буфер 0,05 М рН 7,4 - 565 мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  і 3 г 750 мг  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  розчиняють у 500 мл дистильованої води;
2. глутатіон окислений 0,001 М готують *ex tempore* - 25 мг розчиняють у 40 мл дистильованої води;
3. ЕДАА (етілендіамінтетраоцтова кислота), 0,006 М - 40 мг розчиняють у 50 мл дистильованої води;
4. НАДРН, 0,001 М - *ex tempore* розчиняють 25 мг 25 мл дистильованої води;

**Хід визначення:**

У прямі пробірки вносять:

1. фосфатний буфер 0,05 М – 1,6 мл;
2. НАДРН – 0,2 мл;
3. ЕДАА – 0,5 мл;
4. досліджувана проба – 0,2 мл.

Проби поміщають у термостат для попередньої інкубації на 20 хв при 37° до встановлення в реакційному середовищі ферментативного рівноваги. Після преінкубації визначають перше показання екстинкцій ( $E_1$ ) на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм проти дистильованої води. Після чого запускають глутатіонредуктазну реакцію внесенням в проби окисленого глутатіону по 0,5 мл і проби поміщають на інкубацію в термостат при 37°С протягом 1 години. Після інкубації знімають друге показання екстинкції ( $E_2$ ). Знаходять різницю екстинкцій ( $E_1 - E_2$ ).

Формула розрахунку активності глутатіонредуктази:

$$\underline{\Delta E * 3}$$

$$6,22 * 3600 * n, \text{ мкмоль/с в 1 г або мл досліджуваного,}$$

де:

$\Delta E$  - різниця екстинкцій у пробах;

3 - об'єм кювети у мл;

6,22 – оптична щільність 1 мкмолью НАДФН;

3600 с - час інкубації с;

n – розведення.

## 2.4. СИСТЕМА ОКСИДУ АЗОТУ - РЕГУЛЯТОР СУДИННОГО ТОНУСУ

Основним регулятором судинного тонузу в організмі є оксид азоту, вміст якого при метаболічному ацидозі значно зростає (у 1000 разів) порівняно з метаболічним алкалозом, що спричиняє дилатацію судин середньої ланки та мікроциркуляторного судинного русла. При метаболічному ацидозі в умовах гіпоксії утворюється приблизно в 1000 разів більше оксиду азоту при підвищеному вмісті нітритів та нітратів у зворотних нітрит- та нітратредуктазних реакціях /53/. Значно менша кількість оксиду азоту утворюється у прямій NO-синтазній реакції при метаболічному алкалозі, що спричиняє констрикцію судинного русла.

### *2.4.1. Визначення вмісту нітритів та нітратів*

Принцип методу полягає у освіті з нітритів і нітратів у присутності реактиву Гриса забарвленого комплексу з максимумом поглинання при 540 нм /54, 55/.

#### **Реактиви:**

1. Реактив Гриса (готовий реактив) – 353 мг реактиву Гриса розчиняють у 100 мл 30 % оцтової кислоти;

реактив Гриса можна зробити самим:

А) 0,5 г сульфанілової кислоти розчиняють у 150 мл 30% оцтової кислоти,

б) 0,1 г нафтіаміну розчиняють у 20 мл киплячої дистильованої води, фільтрують і з'єднують із сумішшю А.

2. 30% оцтова кислота – 29,13 мл крижаної оцтової кислоти розчиняють у 100 мл дистильованої води.

**Хід визначення нітритів ( $\text{NaNO}_2$ ):**

1. досліджуване – 0,2 мл;
  2. вода дистильованої – 2,0 мл;
  3. реактив Гриса – 2,0 мл;
- (порядок розливу важливий).

Для визначення нітритів вимірюють оптичну щільність у пробах на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм в 1 см кюветі проти дистильованої води.

Формула розрахунку вмісту нітритів ( $\text{NaNO}_2$ ) у пробі:

**Пп \* Се ;**

**Пе**

де:

Се - концентрація нітритів в еталоні - 0,01% розчину  $\text{NaNO}_2$ ;

Пе – оптична щільність зразка;

Пп – оптична щільність проби.

**Хід визначення нітратів ( $\text{NaNO}_3$ ):**

1. досліджуване – 0,2 мл;
2. вода дистильованої – 2,0 мл;
3. реактив Гриса – 2,0 мл;
4. цинк металевий - 1 г (приблизна вага цинку в гранулах);



Реакція триває протягом 10 хвилин, після чого вимірюють оптичну щільність в пробах на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм в 1 см кюветі проти дистильованої води.

Формула розрахунку вмісту нітратів ( $\text{NaNO}_3$ ) у пробі:

$$\frac{P_{\text{п1}} \times C_{\text{e}} - C_{\text{NO}_2}}{P_{\text{e}}}$$

де:

Для кількісного аналізу будують криві вмісту нітритів і нітратів в еталонах - розчинах  $\text{NaNO}_2$  і  $\text{NaNO}_3$ .

Готують розведення 0,1 N вихідних розчинів  $\text{NaNO}_2$  і  $\text{NaNO}_3$ : 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256. Визначають оптичну щільність розведень та будують криві вмісту нітритів та нітратів у розчинах.

#### ***2.4.2. Визначення активності синтази оксиду азоту***

**Принцип методу:** синтаза оксиду азоту (NO-синтазу) каталізує утворення оксиду азоту (NO) з аргініну, що є субстратом реакції. Як донора електронів використовують НАДФН /56/.

#### **Реактиви:**

1. 0,1 М трис - HCl буфер рН 7,4 - 6,05 г трис - HCl розчинити в 500 мл дистильованої води;
2. аргінін - 320 мкМ – розчинити 4,544 мг на 100 мл дистильованої води;
3. кальцій хлористий 10 мМ - 0,11 г розчинити у 100 мл дистильованої води;

4. NADPH 1 мМ - 3 мг на 1 мл дистильованої води ex tempore.

**Хід визначення:**

1. 0,1 М трис - HCl буфер рН 7,4. - 2,5 мл;
2. CaCl<sub>2</sub> – 0,1 мл;
3. NADPH – 0,1 мл;
4. досліджувана проба – 0,1 мл.

Проби струснути і помістити в термостат на 1 годину при 37° С для преінкубації до встановлення ферментативної рівноваги. Визначають показання оптичної щільності ( $E_1$ ) на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм проти дистильованої води.

Потім реакцію визначення активності синтази оксиду азоту запускають внесенням в інкубаційне середовище субстрату - 0,3 мл розчину аргініну. Проби струшують і ставлять у термостат на 30 хв при 37° С. Після інкубації визначають за спадом NADPH показання екстинкцій дослідних проб ( $E_2$ ). Знаходять різницю екстинкцій ( $E_1 - E_2$ ).

Формула розрахунку активності NO-синтази:

$$\frac{\Delta E * 3}{6,22 * 1800 * n};$$

де:

$\Delta E$  - різниця екстинкцій до та після додавання в проби субстрату - розчину аргініну;

3 - об'єм кювети у мл;

6,22 - оптична щільність 1 мкмоль NADPH;

1800 - час інкубації в секундах;

n - розведення щодо 1 г або 1 мл досліджуваного.

Активність NO-синтази виражають у нмоль NADPH, що окислюється за 1 с в 1 г тканини або 1 мл досліджуваного.

## **2.5. Традиційні методи дослідження КОС**

Дослідження показників кислотно-основного стану крові щурів (рН, рСО<sub>2</sub>, О<sub>2</sub>), забраної з хвостової вени під вазелінову олію, проводили через 3 дні, 1 та 2 тижні, 1, 2 та 5 місяців від початку моделювання ацидозу та алкалозу на біологічному мікроаналізаторі фірми "Radelkis" (Угорщина). Розрахунки вмісту бікарбонатів та діагноз кислотно-основного стану здійснювали за допомогою номограм.

Отримані результати піддавали статистичній обробці з використанням методів варіаційної статистики Стьюдента.

**Список літератури:**

1. Kellum J.A. Diagnosis and treatment of acid–base disorders. *Textbook of Critical Care* / edited by Grenvik A., Shoemaker P.K., Ayers S., Holbrook P.R. Philadelphia, PA: WB Saunders Co, 1999. P. 839-853.
2. Kellum J.A. Determinants of blood pH in health and disease. *Critical Care*. Volume 4. Article number: 6. 2000. P. 25-29.
3. Severinghaus J.W., Siggard-Andersen O. The 'great trans-Atlantic acid–base debate'. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1993, 53 (suppl 214). P. 99-104.
4. Siggard-Andersen O., Foch-Andersen N. Base excess or buffer base (strong ion difference) as measure of a non-respiratory acid–base disturbance. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1995. 39 (suppl 107). P. 123-128.
5. Worthley L: Strong ion difference: a new paradigm or new clothes for the acid–base emperor. *CritCareResusc.* 1999. 1. P. 211-214.
6. Ерюхин И. А., Шляпников С. А. Экстремальное состояние организма. Элементы теории и практические проблемы на клинической модели тяжелой сочетанной травмы. СПб.: Эскулап, 1997. 296 с.
7. Мельничук Д.А. Механизмы образования и биологическое значение карбаматов белков. *Укр. биохим. журн.* 1985. Т.57, N 3. С.98-115.
8. Мельничук Д.А., Скорик Л.В., Сулима И.М. Номограммный способ расчёта величин NAD(P)/NAD(P)H в компартментах клетки. *Укр. биохим. журн.* 1987. Т. 59, № 4. С. 59-64.
9. Мельничук Д.А. Метаболическая система кислотно-щелочного гомеостаза в организме человека и животных. *Укр. биохим. журн.* 1989. Т.65, N 3. С. 3-21.

10. Мельничук Д.О., Михайловський В.О., Мельничук С.Д. Механізми метаболічної адаптації. *Укр. біохім. журн.* 2000. Т. 72, N 4-5. С. 70-80.
11. Мельничук Д.О., Мельничук С.Д., Сілонова Н.Б. Особливості зміни показників кислотно-лужної рівноваги у кролів примодельованні стану штучного гіпобіозу та за умов дії холодового чинника. *Доповіді НАН України.* 2004. N 12. С. 164-167.
12. Мельничук Д.А., Пахомова В.А., Протункевич М.С. Способ оценки кислотно-щелочного состояния в биологических тканях и жидкостях организма: Тезисы докладов VIII Южно-украинской научно-практической конференции «Лечение заболеваний сердечно-сосудистой системы и ассоциированной патологии - мост из прошлого в будущее». Одесса: ОДМУ, 2008. С. 70-72.
13. Мельничук Д.А. О механизме изменений обмена веществ у человека и животных при нарушении кислотно-щелочного равновесия в организме. *Биохимия человека и животных.* 1983. Т.7. С.17-23.
14. Grigorov Ju.G., Sineok G.L. Altersspezifische Besonderheiten des sauran-Basen-Glrichegewichts und seine Vceinflusaung durch verschiedene alimentare Einwirkungen. *Z. Alternsforsch.* 1982. Bd 37, N 4. P. 241-247.
15. Журавский Н.И. Влияние различных концентраций углекислоты на процессы гликолиза и ЦТК в ткани печени крыс. *Укр.биохим.журн.* 1978. Т. 50, № 5. С. 160-162.
16. Журавский Н.И., Мельничук Д.А., Лукинов Д.И. Влияние разных уровней углекислоты крови на биосинтез. *Доклады Академии наук Украинской ССР, серия "Б".* 1980. N 1. С. 65-68.
17. Гулый М.Ф., Мельничук Д.А. Роль углекислоты в регуляции обмена веществ у гетеротрофных организмов. К.: Наук. думка, 1978. 243 с.

18. Бугаева М.Г. Влияние питания белых крыс (самок) диетами, богатыми углеводами, на развитие кариеса зубов у потомства. *Пробл. терапевт. стоматологии*. 1970. №5. С. 11-16.
19. Мельничук Д.О., Пахомова В.О., Протункевич О.О., Россаханова Л.М. Спосіб моделювання метаболічного алкалозу : пат. № 14771 А Україна, МКИ 6 А 61 К 31/00. № 95041898; заявл. 25.04.1995;опубл. 30.06.9, Бюл. N 3. 3 с.
20. Алиментарный фактор в регуляции кислотно-основного состояния и атрофия костной ткани / Е.О. Пахомова, Г.Ф. Белоклицкая, Н.Ф. Коновалов, М.С. Протункевич, В.А. Пахомова. *Вісник морської медицини*. 2005. № 4 (31). С. 30.
21. Губський Ю.І. Біологічна хімія. Підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів освіти III-IV рівнів акредитації. Київ-Тернопіль, «Укрмедкнига», 2000. 508 с.
22. Иванов И.И., Коровкин Б.Ф., Маркелов И.М. Введение в клиническую энзимологию: монография. Л.: Медицина. Ленинградское отд., 1974. 270 с.
23. Литвицкий П.Ф. Клиническая патофизиология: учебник. Москва: Практическая медицина, 2015. 776 с.
24. Великий Н.Н. Никотинамидные нуклеотиды как факторы регуляции липогенеза. *Укр. биохим. журн*. 1984. Т. 56, № 4. С. 369-384.
25. Окатьева Н.А., Бондарь Ю.Н., Пахомова Е.О., Протункевич О.О. Принципиальное обоснование и средство интегральной профилактики распространённых хронических заболеваний у моряков. *Вісник морської медицини*. 2000. № 4. С. 19-21.
26. Wolf Rüdiger Külpmann, H.-K. Stummvoll, Paul Lehmann. Electrolytes,

Acid-Base Balance and Blood Gases. Clinical Aspects and Laboratory. eBook Package English Biomedicine & Life Sciences package. Springer-Verlag, Vienna, 2007. 192 p.

27. Минаков А.И. Гипертрофическая кардиомиопатия и дистрофия миокарда физического перенапряжения: автореф. дис. ... доктора мед. наук : 14.00.06 «Кардиология». Киев, 1990. 46 с.

28. Бурдейний І.В. Структурно-функціональні зміни серця та їх корекція у працівників морського транспорту, які страждають на ішемічну хворобу серця: автореф. дис. ... канд.мед. наук : 14.01.34 «Авіаційна, космічна та морська медицина», Одеса, 1999. 19 с.

29. Коломиец С.Н. Влияние фторида натрия на ритмогенез, функциональное состояние сердца, метаболизм и гемостаз при остром инфаркте миокарда: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.06 «Кардиология». Киев, 1990. 22 с.

30. Коцюбко О.Г. Застосування низькоенергетичного лазерного випромінювання і фториду натрію в лікуванні миготливої аритмії у хворих на ішемічну хворобу серця : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.33 «Курортологія та фізіотерапія». Одеса, 1996. 21 с.

31. Мацегора Н.О. Диференційоване застосування фізичних чинників у комплексному відновлювальному лікуванні хворих на жовчнокам'яну хворобу після ударнохвильової літотрипсії або холецистектомії: автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.01.33 «Медична реабілітація, фізіотерапія та курортологія». Одеса, 2005. 40 с.

32. Тбілелі В.В. Ефективність застосування низькочастотного магнітного поля у комплексному лікуванні остеопорозу при ревматоїдному артриті: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.33

«Курортологія та фізіотерапія». Одеса, 2004. 24 с.

33. Лобенко А.А., Пахомова Е.О., Протункевич О.О. Интегративные регуляторные механизмы остеопороза и пути коррекции. *Вісник куртології, фізіотерапії та мед. реабілітації*. 2002. № 4. С. 25-28.

34. Руденко М.М., Коновалов Н.Ф., Цевух Л.Б., Протункевич О.О. Влияние минеральных соединений на окислительно-восстановительные свойства тканей при кариезогенном рационе в эксперименте. *Медична реабілітація, курортологія, фізіотерапія*. 2003. № 4. С. 32-34.

35. Солдатова А.М. Роль свободнорадикальных, окислительно-восстановительных процессов и видимого света в патогенезе склеротической макулодистрофии и её дифференцированное лечение: автореф. дис. ... доктора мед. наук: 14.00.08 «Глазные болезни». Одесса, 1992. 36 с.

36. Гулюк А.Г. Методи поетапного хірургічного лікування хворих з вродженою розщипиною верхньої губи і піднебіння: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.22 «Стоматологія». Полтава, 2002. 37 с.

37. Мельничук Д.О., Розанов В.А., Пахомова О.О., Пахомова В.О. Спосіб оцінки впливу чинників ризику на людину та тварин шляхом оцінки інтегрального функціонального стану організму : пат. № 17360 А Україна, МКИ 6 А 61 В 5/00. № 95041907; заяв. 25.04.95; опубл. 31.10.97; Бюл. N 5. 4 с.

38. Мельничук Д.О., Пахомова В.О.; заявники та патентовласники автори. Спосіб визначення зрушень кислотно-лужної рівноваги в біологічних тканинах і рідинах: пат. № 17090 Україна, МКВ 6 А61В 5/00. № 94042987; заявл. 11.04.94; опубл. 31.10.97, Бюл. № 5. 6 с.

39. Протункевич М.С. Спосіб визначення зрушень кислотно-лужної



рівноваги у біологічних тканинах і рідинах : пат. № 107778 Україна, МПК (2015/01) А 61 В 5/00, G 01 N (2006/01) 33|48; заявник та патентовласник автор. № у 2013 15495; заявл. 30.12.2013; опубл. 10.02.2015. Бюл. № 3. 4 с.

40. Мельничук Д.О., Косенко М.В., Пахомова В.О., Левицкий Т.Р., Пахомова О.О., Протункевич О.О. Засіб для інтегральної корекції метаболічного ацидозу та алкалозу біологічних тканин і рідин: пат. № 37814 А Україна, МКИ 5 А 61 К 33/00; № 2000042227; заявл. 18.04.2000; опубл. 15.05.2001, Бюл. N 4. 3 с.

41. Ленинджер А. Основы биохимии. Т. 3. М.: Мир, 1985. 1051 с.

42. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия. М.: Мир, 2000. 469 с.

43. И.В. Веревкина, А.И. Точилкина, Н.А. Попова. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977.С. 223-231.

44. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 1959. 82(1): P. 70-75.

45. Eyer P. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment / P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko et al // Analytical Biochemistry. – 2003. – Vol. 312. – P. 224–227.

46. Путилина Ф.Е. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учебное пособие / под ред. проф. Прохоровой М.И. - Л., 1982. С.161-164.

47. Панин Л.Е., Нечаев Ю.С., Поляков Д.М. Использование циркадных ритмов для анализа взаимоотношений между содержанием глюкокортикоидов в крови и активностью ключевых ферментов глюконеогенеза в печени и клетках крыс // Вопросы мед. химии. – 1977. – Т. 23, № 1.- С. 159-160.

48. Lecoco J., Inesi G. Determination of inorganic phosphate in the presence of adenosinetriphosphate by the molybdovanadate method // *Analyt. Biochem.* – 1966. - Т. 15, N 7.- S. 160-163; РЖБХ, 1967. – 5 ф 24.- с. 4.
49. Определение активности пируваткиназы //Практикум по биохимии /Под ред. Н.П. Мешковой, С.Е. Северина.- М., 1979.-С. 259-260.
50. Пахомова В.А., Козлянина Н.П., Крюкова Г.Н. Способ определения активности малатдегидрогеназы: а.с. 930122 СССР, МКИ<sup>3</sup> д.01 № 33/48. №2873074/28-13; заявл. 20.11979; опубл. 23.05.1982; Бюл. № 19. 4 с.
51. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК) //Современные методы в биохимии /Под ред. В.Н. Ореховича.- М.,1977.-С. 66-68.
52. Путилина Ф.Е. Определение активности глутатион-редуктазы // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) /под ред. проф. Прохоровой М.И. - Л., 1982. - С.181-183.
53. Биохимические основы патологических процессов / Под ред. член-корр. РАН Е.С. Северина. М.: Медицина, 2000. 290 с.
54. Кіселюк І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та іншої етіології. *Лаб. діагностика*. 2001. № 3. С. 43-45.
55. Green L.C., Wagner D.A., Glogowsk J. Et al. Analisis of nitrate and nitrite. Nitrate in biological fluids. *Analyt. Biochem.* 1982. N 126.P. 131-138.
56. Сумбаев В.В. Ясинская И.М. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс. *Современные проблемы токсикологии*. 2000. №3. С. 3-5.

