

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ І ТЕХНОЛОГІЙ
У ТВАРИННИЦТВІ

*Кафедра гігієни тварин та ветеринарного
забезпечення кінологічної служби НПУ*

КУРС ЛЕКЦІЙ

з дисципліни

**«СУЧАСНІ БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ У
ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ»**

для здобувачів вищої освіти ІІІ (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за
спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина»
освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини



м. Кам'янець-Подільський

2023

УДК 619:616

Укладач:

Тетяна СУПРОВИЧ,

доктор сільськогосподарських наук, професор; завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби НПУ

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою
Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»
(протокол № 9 від 21.11.2023 р.)*

Рецензенти:

Микола КУХТИН,

доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.

Юлія ГОРЮК,

доктор ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Курс лекцій з дисципліни «Сучасні біохімічні методи досліджень у ветеринарній медицині» для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». Освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини / Т.М. Супрович. Кам'янець-Подільський, ЗВО ПДУ. 2023. 73 с.

Методичні рекомендації розроблено з метою закріплення теоретичних знань і набуття практичних навичок

© ЗВО ПДУ, 2023

ЗМІСТ

Вступ	4
ТЕМА1. Характеристика об'ємно-аналітичних, електрохімічних, хроматографічних методів дослідження.....	5
ТЕМА2. Діагностика порушень активності індикаторних і неспецифічних ензимів в органах і тканинах організму тварин	18
ТЕМА3. Ізоферменти та їх роль у лабораторній діагностиці.....	27
ТЕМА 4. Метаболічні, біосинтетичні, дезінтоксикаційні та екскреторні функції печінки в нормі та при патології	39
ТЕМА 5. Лабораторна діагностика порушень функціонування системи гомеостазу за системних хвороб тварин.....	44
ТЕМА 6. Лабораторна діагностика порушень метаболізму в нефроцитах за нефропатій і функціональних розладів органів сечовиділення	52
ТЕМА 7. Клінічна біохімія злоякісних пухлин.....	61
Список використаних джерел	73

ВСТУП

Дисципліна «Сучасні біохімічні методи досліджень у ветеринарній медицині» є вибірковою компонентою науково-фахового спрямування здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти на базі ОС «Магістр», ОКР «Спеціаліст» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина», освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини

Мета вивчення предмету є сформувати в аспірантів необхідні теоретичні знання й практичні уміння з питань методології проведення різноманітних біохімічних досліджень та комплексної оцінки біохімічних показників різного біологічного матеріалу, отриманого від хворих тварин, для визначення функціонального стану їх організму та лабораторної діагностики хвороб різних систем і органів, правильної інтерпретації одержаних результатів, а також забезпечення якості функціонування біохімічних лабораторій.

В результаті вивчення дисципліни здобувачі мають поглибити професійні знання, підвищити рівень умінь та навичок, формування досвіду науково-дослідницької роботи з ветеринарної клінічної біохімії.

ТЕМА1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄМНО-АНАЛІТИЧНИХ, ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ, ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Тема 1.1. Об'ємно-аналітичні методи дослідження

В основі кількісного хімічного аналізу лежить проведення хімічних реакцій між зразком, який досліджується, та підібраними й приготовленими реактивами. За кількістю витрачених реактивів або здобутих продуктів реакції розраховують склад аналізованого зразка.

Хімічний аналіз поділяють на ваговий та об'ємний. Ваговий (гравіметричний) аналіз базується на повному (кількісному) виділенні будь-якого компонента з аналізованого зразка у вигляді певної речовини з наступним точним зважуванням.

Об'ємний (*титриметричний*) аналіз ґрунтується на точному визначенні об'єму розчину речовини (відомої концентрації), який необхідний для повного перебігу реакції з даним об'ємом досліджуваного розчину. Кількість речовини у розчині визначають титруванням – до розчину з аналізованою речовиною поступово приливають розчин з точно відомою концентрацією речовин.

Кінцеву точку титрування (*точку еквівалентності*) визначають за використання індикаторів чи фізико-хімічними методами (за електропровідністю, світлопропусканням тощо). За кількістю робочого розчину, що пішов на титрування, розраховують результати аналізу.

Типи титрування:

- Пряме титрування – розчин досліджуваної речовини безпосередньо титрують стандартним розчином (титрант).
- Зворотне титрування застосовують тоді, коли речовина, яка визначається, не реагує з титрантом. У цьому випадку до досліджуваного розчину додають надлишок (певний об'єм) розчину третьої речовини відомої концентрації, яка реагує з досліджуваною речовиною в еквівалентній кількості. Надлишок третьої речовини відтитрують стандартним розчином.
- Замісне титрування застосовують, якщо речовина, яка визначається, не взаємодіє з титрантом або реагує з ним не в стехіометричному відношенні. У цьому випадку до досліджуваного розчину додають спочатку явний надлишок реагенту, а потім титрують один з продуктів реакції титрантом.

Способи вираження концентрації розчинів

Розчини готуються з розрахункових кількостей окремих компонентів. При цьому тверді речовини беруться за масою, а рідкі – за об'ємом. Залежно від точності роботи речовини відважують на техніко-хімічних чи аналітичних вагах, а рідину відмірюють мірними циліндрами чи скляними або автоматичними піпетками. Для розчинення наважки використовують колби чи хімічні стакани, або циліндри.

Для приготування розчину з певною концентрацією придатні лише ті речовини, які можуть бути отримані у чистому вигляді, мають постійний склад, не змінюються на повітрі та при зберіганні. До таких речовин належать багато солей (калію біхромат, натрію хлорид та ін.), кислот (щавлева, бурштинова).

Речовини, які задовільняють перелічені вимоги, називаються вихідними або стандартними.

Кожний розчин має якісну та кількісну характеристику. Кількісний склад розчину визначається кількісним співвідношенням розчинника та розчиненої речовини і виражається кількістю або концентрацією розчинених речовин в одиниці об'єму.

Концентрація розчинів виражається найчастіше у відсотках – вагових, об'ємно-вагових або об'ємних, у грам-молях на 1 дм³ розчину, грам-еквівалентах на 1 дм³ розчину та титром.

Відсоткові розчини – це розчини, в яких концентрація визначається кількістю речовини в грамах у 100 г розчину (вагова відсоткова концентрація, m_b/m_a), кількістю речовини в грамах у 100 см³ розчину (об'ємно-вагова концентрація, m_b/V), кількістю мілілітрів розчиненої речовини у 100 см³ розчину (об'ємна концентрація, V/V):

$$C_{\%} = \frac{m_b}{m_a + m_b} \cdot 100\%,$$

де m_b – маса розчиненої речовини; m_a – маса розчинника.⁴

Молярні розчини (C_m або M) – це розчини, в 1 дм³ яких міститься певне число грам-молекул розчиненої речовини:

$$C_m = m/(V \cdot M),$$

де m – маса розчиненої речовини, г;

V – об'єм розчину, л;

M – молекулярна маса речовини.

Грам-молекула – це кількість речовини в грамах, яка чисельно дорівнює відносній молекулярній масі цієї речовини. Наприклад, молекулярна маса

NaCl становить 58,45, тому грам-молекула NaCl дорівнює 58,45.

Користуватися молярними розчинами зручно в тому розумінні, що за однакової молярної концентрації рівні об'єми розчинів різних речовин містять однакове число молекул.

Нормальні розчини – це розчини, в 1 дм³ яких міститься грам-еквівалент розчиненої речовини (позначаються – н, або N):

$$CN = m / (V \cdot E).$$

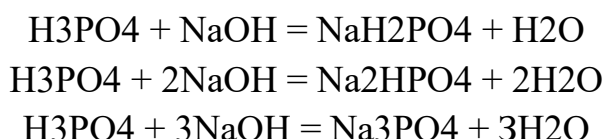
Грам-еквівалент (г-екв.) – це кількість грамів речовини, еквівалентна (хімічно рівноцінна) грам-атому або грам-іону водню (1,008 г) у цій реакції.

При визначенні еквівалента елемента необов'язково виходити з його сполуки з воднем. Еквівалент можна розрахувати за складом сполуки даного елемента з будь-яким іншим, еквівалент якого відомий.

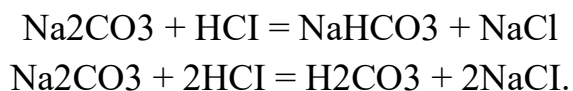
Грам-еквівалент розраховується шляхом ділення молекулярної маси речовини (M) на число зарядів або електронів (n), які беруть участь у відповідній реакції:

$$E = M / n.$$

З цього випливає, що грам-еквівалент однієї і тієї ж речовини, яка вступає в різні реакції, може бути різним. Наприклад:



або:



Грам-еквівалент речовини, яка бере участь в окисно-відновних реакціях, дорівнює молекулярній масі, поділеній на число відданих або прийнятих молекулою речовини електронів.

Через те, що хімічні речовини взаємодіють в еквівалентних кількостях, розчини однакової нормальності реагують у рівних об'ємах. У загальному випадку об'єми розчинів речовин, що прореагували, обернено пропорційні їхнім нормальностям:

$$V_1 / V_2 = N_2 / N_1 \text{ або } N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2.$$

Титровані розчини. *Титр* – це кількість грамів розчиненої речовини в 1 см³ розчину; він розраховується шляхом поділу маси на об'єм (г/см³):

$$T = m/V.$$

Титр розчину за його нормальністю розраховують за формулою:

$$T = N \cdot E / 1000,$$

де N – нормальність розчину, E – еквівалент розчиненої речовини.

Титр розчину за його відсотковою концентрацією розраховують за формулою:

$$T = C\% \cdot \rho / 100,$$

Де C% – концентрація у відсотках; ρ – густина розчину, г/см³

За точністю вираження концентрації розчини поділяють на точні й наближені. Точними розчинами вважаються молярні, нормальні і титровані; вони використовуються переважно для аналітичних досліджень. До наближених належать розчини, концентрація яких виражена у вагових або об'ємних відсотках.

Визначення густини розчинів

При виконанні тих чи інших біохімічних досліджень часто доводиться визначати густину деяких рідин – розчинів, кислот, спиртів, твердих та газоподібних речовин, а також біологічних речовин – сечі, молока тощо.

Густина (питома маса) – це відношення маси речовини до її об'єму; вона показує, у скільки разів маса аналізованої рідини більша або менша, ніж маса води, взятої в такому ж об'ємі:

$$\rho = \frac{m}{V},$$

де ρ – густина речовини, г/см³;

m – маса речовини, г;

V – об'єм тіла, см³

Розрізняють абсолютну та відносну густину. *Абсолютна густина*

виражається в кілограмах на кубічний метр (кг/м³). *Відносна густина* – це відношення густини досліджуваної речовини до густини дистильованої води при $t = 4^{\circ}\text{C}$ (іноді – іншої сполуки):

$$d = \frac{\rho_{\text{речовини}}}{\rho_{\text{води}}}.$$

У повсякденній практиці звичайно користуються відносною густиною. Визначати відносну густину рідин можна за допомогою ареометрів (рис. 1.1). Ці вимірювальні прилади являють собою скляну трубку, яка розширюється донизу і заповнена свинцевим дробом, ртуттю або іншим важким матеріалом. У верхній, тоншій частині є шкала з поділками, яка показує густину рідини. При визначенні густини ареометр занурюється в розчин тим глибше, чим менша густина розчину. Іноді ареометри оснащені термометрами, що дозволяє одночасно вимірювати і температуру.

Густина розчину залежить і від температури: при її зниженні відносна густина збільшується, а при підвищенні – зменшується. Тому всі виміри густини розчинів слід проводити при постійній температурі. Густина розчину, як правило, залежить від концентрації: вона збільшується зі збільшенням концентрації розчиненої речовини.



Рис. 1.1. Ареометри різних типів

Види титриметричного аналізу

В основі титриметричного аналізу покладено такі типи хімічних реакцій:

– нейтралізації (кисотно-лужне титрування) – нейтралізація – реакції зі зміною рН розчинів.

– окиснення-відновлення (перманганатометрія, йодометрія, хроматометрія) реакції, які протікають зі зміною окиснювально-відновних потенціалів в системі титрування.

– осадження (аргентометрія, роданідометрія, меркуриметрія) – реакції, які протікають з утворенням малорозчинної сполуки, при цьому змінюються концентрації осаджуваних іонів в розчині.

– комплексоутворення (комплексометрія) – реакції, які засновані на утворенні комплексних сполук іонів металів (всіх, окрім одновалентних) з комплексом. При цьому змінюються концентрації іонів металів в розчині, який титрується.

1. Метод нейтралізації. Основною реакцією в методі нейтралізації є реакція взаємодії іонів водню H^+ і гідроксид-іонів OH^-

. Тому суть реакції нейтралізації полягає в перенесенні іонів водню (протонів) від кислоти до лугу.

Кисотно-лужні реакції супроводжуються зміною концентрації іонів водню, які визначаються у методах кисотно-лужного титрування.

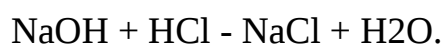
Використовуючи розчин будь-якої кислоти (органічної або неорганічної), можна визначати кількість лугу (ацидиметрія), а використовуючи титровані розчини лугів – кислоти (алкаліметрія). За допомогою цього методу визначають також деякі солі, що мають сильно лужну реакцію внаслідок гідролізу і тому титруються кислотами (наприклад Na_2CO_3 , $Na_2B_4O_7$).

При титруванні за методом нейтралізації, по-перше, слід зафіксувати момент, коли кислотність або лужність розчину досягне потрібного значення, а по-друге, визначити, за якого рівня кислотності або лужності розчину титрування слід закінчувати.

Момент закінчення реакції титрування, тобто точку еквівалентності, як правило, визначають за зміною кольору індикатора – речовини, яка змінює своє забарвлення залежно від значення рН розчину. Очевидно, що відповідно до того, в кислому або лужному середовищі знаходиться індикатор, його власна дисоціація буде зменшуватись або зростати, про що і свідчити колір розчину.

Титрування закінчують у різних середовищах залежно від сили кислот і лугів, що нейтралізуються.

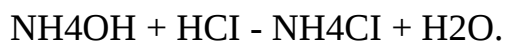
1. Титрування сильного лугу сильною кислотою, або навпаки. Наприклад, розчин $NaOH$ титрують розчином HCl :



Утворений $NaCl$ є сіллю сильного лугу і сильної кислоти, яка не піддається гідролізу, і тому в точці еквівалентності рН розчину не змінюється і дорівнює 7.

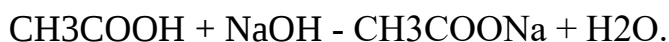
Найбільш придатним індикатором у цьому разі є лакмус або нейтральний червоний, але, якщо в розчині присутній CO_2 , застосовують метиловий оранжевий; за відсутності CO_2 можна титрувати з фенолфталеїном.

2. Титрування слабкого лугу сильною кислотою, або навпаки. Наприклад, розчин NH_4OH титрують розчином HCl :



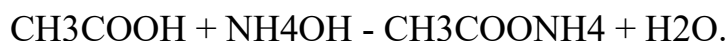
Унаслідок гідролізу утвореної солі слабкого лугу і сильної кислоти NH_4Cl у точці еквівалентності розчин має слабо кислу реакцію ($\text{pH} = 5,2$). Тому при титруванні слід застосовувати індикатор з інтервалом переходу забарвлення за pH 4,4–6,2, тобто метиловий червоний.

3. Титрування слабкої кислоти сильним лугом, або навпаки. Наприклад, розчин CH_3COOH титрують розчином NaOH :



У точці еквівалентності внаслідок гідролізу утвореної солі слабкої кислоти і сильного лугу CH_3COONa реакція розчину слабо лужна ($\text{pH} = 8,9$). Тому при титруванні слід застосовувати індикатор з інтервалом переходу забарвлення за pH 8,2–10,0, тобто фенолфталеїн.

4. Титрування слабкої кислоти слабким лугом, або навпаки. Наприклад, розчин CH_3COOH титрують розчином NH_4OH :



У точці еквівалентності реакція середовища нейтральна. Теоретично таке титрування треба проводити, застосовуючи індикатор з інтервалом переходу забарвлення за pH 7,0, але практично таке титрування неможливе, тому що в точці еквівалентності не відбувається різкої зміни pH розчину, внаслідок чого забарвлення індикатора також не змінюється. Пояснюється це тим, що слабо-дисоційовані кислоти й луги не здатні спричинити різкої зміни дисоціацій індикатора.

Залежність pH титрованого розчину від об'єму прилитого розчину лугу і його концентрації зручно виражати графічно, відкладаючи по осі ординат значення pH , а по осі абсцис – об'єми лугу.

Крива, яка виражає зміну значення pH титрованого розчину в залежності від об'єму прилитого робочого розчину називається кривою титрування.

Горизонтальну лінію, яка проходить через точку, що відповідає $\text{pH} = 7$,

називають лінією нейтральності, а вертикальну, яка проходить через точку еквівалентності, – лінією еквівалентності. Форма кривої титрування буде визначатися характером взаємодії титруемого і робочого розчину, тобто силою кислоти і лугу.

Момент закінчення титрування встановлюють за зміною кольору кислотно-основного індикатора. Індикатор слід вибрати у відповідності з кривою титрування таким чином, щоб стрибок титрування відповідав інтервалу переходу індикатора в точці еквівалентності. Точку еквівалентності можна також встановлювати за допомогою спеціальних приладів, наприклад рН-метрів.

2. Методи оксидиметрії. При оксидиметричному титруванні використовуються реакції окиснення-відновлення, які супроводжуються переходом електронів від одних молекул, атомів, іонів (відновників) до інших (окисників). Унаслідок цього змінюються ступені окиснення атомів, що входять до складу реагуючих речовин. Окиснення – це процес віддачі електронів, а відновлення – процес їх приєднання. Тому ступінь окиснення атома зростає при окисненні і зменшується при відновленні.

Робочими розчинами в оксидиметрії є розчин окисників (KMnO_4 , I_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KBrO_3 та ін.) і відновників ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, SnCl_2 , NaAsO_2 та ін.).

Усі методи оксидиметрії класифікують залежно від окисника або відновника, які використовуються в робочому розчині. Наприклад, якщо метод базується на окисненні перманганатом, його називають перманганатометрією, на окисненні йодом – *йодометрією*, на окисненні хроматом – хроматометрією та ін.

Йодометрія. Вільний йод здатен забирати електрони від речовин, які легко їх віддають (відновники), і тому є окисником. Іони I^- під впливом речовин, які здатні приєднувати електрони – окисників, легко віддають їх і виступають таким чином як відновники.

Виходячи з цього, можна констатувати, що метод йодометрії ґрунтується на окисно-відновних процесах, які пов'язані з перетворенням елементарного йоду на іони I^- , або навпаки. Речовини, які окиснюються, можна визначати за кількістю вільного йоду, який вступає в реакцію з ними. Відновлюючі речовини визначаються за кількістю виділеного при реакції з ними вільного йоду. Таким чином, визначаючи кількість йоду до і після реакції можна обчислити кількість окисненої або відновленої речовини.

В якості робочого розчину застосовують розчин натрію тіосульфату $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, та йоду, а індикатором виступає крохмаль.

3. Методи осадження. Методами осадження називають методи об'ємного аналізу, які ґрунтуються на використанні реакцій, що супроводжуються випадінням осаду.

Реакції осадження належать до оборотних іонообмінних реакцій. Вони відбуваються в тому випадку, коли протилежно заряджені іони двох розчинних речовин-електролітів утворюють малорозчинну речовину.

4. Метод комплексометрії. Комплексонометричний метод аналізу ґрунтується на використанні реакцій, які супроводжуються утворенням комплексних сполук катіонів з комплексонами – органічними речовинами, які відносяться до класу амінополікарбонових кислот. Робочими розчинами в комплексометрії є розчини комплексонів. До аналізованого розчину при титруванні додається буферний розчин для створення потрібного значення рН та індикатор. Для встановлення точки еквівалентності застосовують спеціальні металоіндикатори органічної природи – мурексид, еріохром чорний Т (хромоген спеціальний ЕТОО), кислотний хром темно-синій та деякі інші. Їхній колір різко відрізняється від кольору розчину самого індикатора.

Електрохімічні методи аналізу

Електрохімічні методи аналізу (ЕХМА) – група методів кількісного хімічного аналізу, в основі яких лежать електрохімічні процеси. Для них характерні висока чутливість і селективність, швидкість відгуку на зміну складу аналізованого об'єкта, легкість автоматизації та можливість дистанційного управління. І, нарешті, вони не вимагають дорогого аналітичного устаткування і можуть застосовуватися в лабораторних і виробничих умовах.

Електрохімічні методи аналізу засновані на дослідженні процесів, що протікають на поверхні електрода або в навколоелектродному просторі.

Аналітичним сигналом служить електричний параметр (електричний потенціал, сила струму, опір та ін.), який піддається вимірюванню. За вимірюваним електричним параметром системи, ЕХМА поділяють на потенціометрію (вимірюють E , В при $I = 0$ А), вольтамперометрію (вимірюють I , А як функцію від накладеного ззовні E , В), кулонометрію (вимірюють Q , Кл при $I = \text{const}$ або $E = \text{const}$), кондуктометрію (вимірюють W , См або Ом-1). Деякі електрохімічні методи використовуються для визначення кінцевої точки титрування (амперметричне титрування, кондуктометричне титрування, кулонометричне титрування)

Вольтамперометрія – це електрохімічний метод якісного та кількісного аналізу, який ґрунтується на реєстрації вольт-амперних кривих (вольтамперограм) – залежності між силою електричного струму I у ланцюзі і напругою E при електролізі розчину досліджуваної речовини. У розчин занурюють індикаторний мікроелектрод, на якому досліджувана електрохімічно

активна (електроактивна) речовина – деполяризатор відновлюється чи окиснюється, і неполяризований допоміжний електрод порівняння, потенціал якого залишається практично незмінним при електролізі.

Кондуктометричні методи аналізу засновані на вимірюванні електропровідності досліджуваних розчинів і застосовуються для визначення концентрації солей, кислот, лугів і т. д. Електропровідність – здатність речовини проводити електричний струм. Обернена їй величина називається електричним опором. Електропровідність (іонна провідність) розчину (W) обернена величині опору (R):

$$W=1/R.$$

Одиниця виміру електропровідності – сіменс (См) або Ом^{-1} .

Більшість рідин не мають вільних носіїв заряду і є діелектриками. Виняток становлять електроліти, наприклад вода чи розчини солей у воді. В електролітах частина нейтральних молекул дисоціює, утворюючи негативно та позитивно заряджені іони. Електропровідність електролітів зумовлена рухом цих іонів до аноду і катоду, відповідно. Електропровідність електроліта є адитивною величиною, тобто визначається властивостями всіх іонів, які присутні в розчині. Електропровідність залежить від кількості носіїв заряду в одиниці об'єму розчину (концентрації), їх складу та рухомості. Отже, електропровідність розчину є показником концентрації розчиненої речовини, а вимірювання електропровідності розчинів може бути використане для кількісного визначення хімічного складу розчину (кондуктометрія).

В аналітичній хімії користуються питомою електропровідністю (χ) – здатністю розчину електроліту проводити електричний струм – величина, яка обернена питомому опору розчину (ρ)

$$\chi = 1/\rho.$$

У Міжнародній системі одиниць СІ питома електропровідність вимірюється в сименсах на метр ($\text{См} \cdot \text{м}^{-1}$).

Спектрофотометричні методи аналізу

До молекулярних абсорбційних методів відноситься *фотометричний аналіз*, який заснований на вимірюванні поглинання світла речовиною. Він включає саме спектрофотометрію (метод з використанням монохроматичного світла як у видимій, так і ультрафіолетовій та інфрачервоній частинах оптичного

спектру) та фотоелектроколориметрію (метод, заснований на вимірюванні інтенсивності вузької смуги поліхроматичного світла у видимій частині оптичного спектру, яку виділяють, зокрема, світлофільтрами).

Кожна речовина поглинає світло з певними (характерним лише для неї) довжинами хвиль, тобто довжина хвилі поглинутого світла індивідуальна для кожної речовини і на цьому заснований якісний аналіз. Максимум поглинання світла в певній спектральній області є важливою оптичною характеристикою речовини, а весь спектр поглинання характеризує його якісну індивідуальність.

У забарвлених речовинах максимум поглинання світла частіше знаходиться у видимій частині спектру, проте він може бути і в ультрафіолетовій та ближній інфрачервоної області.

Вимірювання поглинання світла, яке проходить крізь досліджуваний розчин унаслідок адсорбції його досліджуваною речовиною здійснюють на спеціальних спектральних апаратах, у яких пробу речовини вміщують між джерелом світла та фотоелементом, що реєструє світло.

Фотоколориметрія. При фотоколориметричних методах аналіз здійснюється за поглинанням поліхроматичного світла за допомогою фотоелементів. Прилади для фотоколориметрії – фотоколориметри або фотоелектроколориметри. В фотоколориметрах є можливість часткової монохроматизації спектру світлофільтрами. За їх допомогою обирають ділянку оптичного спектру в тій області довжин хвиль, де поглинання світла для даного розчину мінімальна. Світлофільтри обирають так, щоб максимум поглинання розчину відповідав максимуму пропускання світлофільтра

У спектрофотометрах джерелом випромінювання, як правило, є газорозрядні джерела світла ультрафіолетового і видимого діапазонів. *Ртутні* лампи використовують для одержання лінійного спектра в ультрафіолетовій, видимій та ближній інфрачервоній областях. Для лампи розжарювання максимум спектра випромінювання лежить в ближній інфрачервоній області, але значна частина енергії випромінюється і у видимій та УФ-області оптичного спектра (до 300 нм). *Водневі лампи* мають спектральну область випромінювання в діапазоні 165–500 нм (з найбільшою енергією випромінювання при довжинах хвиль менше 300 нм). Недоліком цих ламп є їх мала потужність. Тому більш ефективними є дейтерієві лампи, особливо в області спектру 250–290 нм. *Газорозрядні лампи* надвисокого тиску заповнені інертним газом (як правило ксеноном) при електричному розряді дають майже рівномірний спектр.

Світлофільтри – це оптичні пристрої, які змінюють спектральний склад світла або енергію світлових хвиль.

Типи світлофільтрів:

адсорбційні – послаблюють світло за рахунок поглинання світлового потоку речовиною фільтра;

дисперсійні – послаблюють світло за рахунок зміни показника заломлення речовини фільтра;

інтерференційні – дія яких заснована на явищі інтерференції паралельного променя, котрий відбивається двома дзеркалами, які розміщені на відстані довжини хвилі.

Атомна спектроскопія

Атомно-спектроскопічні методи – це методи аналізу, які засновані на вимірюванні енергетичного стану атомів речовин. Вони відрізняються за способом отримання та реєстрації сигналу, а загальним є необхідність попередньої атомізації проб. Атоми речовин, які випаровуються в полум'ї, випромінюють чи поглинають світло певної довжини хвилі. За інтенсивності смуг у спектрі можна визначити кількість окремих хімічних елементів у зразку.

Атомно-абсорбційна спектроскопія заснована на поглинанні атомами випромінювання від зовнішнього джерела.

Атомно-емісійна спектроскопія заснована на випусканні випромінювання атомами, збудженими за використання різних зовнішніх джерел (дуга, іскра, полум'я, плазма).

Атомно-флуоресцентна спектроскопія метод кількісного елементного аналізу по атомних спектрах флуоресценції.

Мас-спектрометрія – метод визначення хімічного складу і молекулярної структури речовини, що базується на реєстрації у спектру мас іонів, утворених внаслідок іонізації атомів і (або) молекул проби. Іонізацію здійснюють пучком електронів або іонів, лазерним випромінюванням тощо.

Рефрактометричний метод аналізу

Рефрактометрія – оптичний метод аналізу, заснований на вимірюванні показника заломлення світла (n) речовиною, яку визначають.

Середовище, в якому швидкість розповсюдження світла менша, є оптично щільнішим. При переході променя світла з середовища оптично менш щільного в середовище з більшою оптичною щільністю кут падіння променя більший за кут заломлення.

Абсолютний показник заломлення – відношення швидкості проходження світла у вакуумі до швидкості проходження світла в речовині, що досліджується.

Відносний показник заломлення – відношення швидкості проходження світла в повітрі до швидкості проходження світла в речовині або відношення синуса кута падіння до синуса кута заломлення

Хроматографія – процес, заснований на багаторазовому повторенні актів сорбції та десорбції речовини при її переміщенні в потоці рухомої фази вздовж нерухомого сорбенту. Розподіл складних сумішей хроматографічним методом засновано на різній сорбції компонентів суміші. При протіканні цього процесу так звана рухома фаза (елюент), що містить аналізовану пробу, переміщується через нерухому фазу. Зазвичай нерухома фаза являє собою речовину з розвиненою поверхнею, а рухлива – потік газу або рідини, що фільтрується через шар сорбенту. При цьому відбувається багаторазове повторення актів сорбції – десорбції, що є характерною особливістю хроматографічного процесу і зумовлює ефективність хроматографічного розділення.

Електрофоретичні методи аналізу

Електрофорез (грецьк. elektron – смола, бурштин; той, що має відношення до електрики, та phoreo – ношу, переносу) – це рух заряджених колоїдних частинок, спричинений дією зовнішнього електричного поля. В свою чергу, колоїдні частинки або колоїди (грецьк. kolla – клей та eidos – вид) становлять собою дисперсні системи, які проміжні між справжніми розчинами та грубодисперсними системами – суспензіями та емульсіями. Рідкі колоїдні системи – золі, а дриглісті – гелі. Колоїдами є, зокрема, амінокислоти, білки, гліко- та ліпопротеїди, полісахариди, нуклеїнові кислоти та ряд інших органічних сполук. Такі речовини містять хімічні групи, які здатні до іонізації.

Тому в розчинах вони можуть існувати в зарядженій формі – у вигляді катіонів (позитивно заряджені) або аніонів (негативно заряджені). Більшість біомолекул – амфотерні (грецьк. amphoteros – і той та інший), тобто це хімічні сполуки, які здатні проявляти кислотні або лужні властивості залежно від речовини, що реагує з ними: в реакціях із сильною кислотою виявляють лужні властивості, а з сильним лугом – кислотні. Це пояснюється присутністю в молекулах великої кількості рухомих протонів (H^+), які характеризуються різними значеннями коефіцієнта активності (pK_a), величина якого в розведених розчинах наближається до значень константи рівноваги.

Електрофорез у градієнті концентрації поліакриламідного гелю.

Перевага цього методу полягає в тому, що такий електрофорез призводить до концентрування компонентів зразка, зокрема білків, оскільки в замикаючій частині кожної окремої зони електрофоретична рухливість вище, ніж в ділянці її переднього фронту.

Завдяки цьому в процесі розділення компонентів зразка смужки звужуються і в кінці електрофорезу стають дуже тонкими. Цей ефект самоконцентрування особливо важливий при дослідженні розведених зразків.

У градієнті концентрації гелю швидкість переміщення макромолекул визначається їх електричним зарядом в області низької концентрації гелю, а також їх розмірами (молекулярною масою) в області високих концентрацій гелю, оскільки ефект молекулярного сита суттєво збільшується у ході макромолекул у більш концентрованому гелі.

У методі *імуноелектрофорезу* проводять, як правило, звичайний електрофорез речовин, які аналізуються (білків, деяких полісахаридів та ін.), в агаровому або агарозному гелі, а потім виявляють ці речовини за допомогою імунодифузії. Імуноелектрофорез звичайно проводять на горизонтальних пластинках гелю.

ТЕМА 2. ДІАГНОСТИКА ПОРУШЕНЬ АКТИВНОСТІ ІНДИКАТОРНИХ І НЕСПЕЦИФІЧНИХ ЕНЗИМІВ В ОРГАНАХ І ТКАНИНАХ ОРГАНІЗМУ ТВАРИН.

1. Властивості і локалізація ферментів.
2. Ензимодіагностика.
3. Метод імуноферментного аналізу (ІФА)

Властивості і локалізація ферментів.

Ферменти – це біологічні сполуки білкової природи, які мають специфічні властивості каталізувати різні перетворення речовин. Фермент (лат. fermentatio - бродіння).

Ензим (грецьке. en zimme-в дріжджах). Обидві назви походять з історії вивчення в ході якого було зроблено припущення, потім підтверджене експериментально, про існування особливих речовин – біологічних каталізаторів. Вивчає ферменти (ензими) – ферментологія (ензимологія). Першим виділеним та очищеним ферментом (1926 р.) була уреаза. У наш час налічується більше 2000 ферментів. Усі біохімічні реакції на яких базується обмін речовин в організмі є високо енергетичними (енергозалежними) і без ферментного каталізу були б неможливі, тобто біологічна роль каталітичної дії ензимів полягає в значному зниженні енергетичного бар'єру цих біохімічних реакцій.

У відмінності від неорганічних каталізаторів ензими у багато разів активніший і реалізує свої властивості за умов нормального тиску, нормальної температури, та рН близької до нейтральної (є винятки). Ензими мають властивості, характерні білковим сполукам, тобто як усі білки, молекули ферменту приймають просторову конфігурацію - конформацію, але на відміну

від звичайних білків ферменти мають у своєму складі 1 або кілька активних центрів, які й забезпечують взаємодію ферменту та субстрату. Субстрат - це хімічна сполука або речовина, перетворення якої і каталізує той чи інший фермент. В реакціях обміну речовин маємо дуже високий специфічність пар фермент – субстрат. Ферменти підрозділяються на 2 великі групи: а. прості (однокомпонентні), що складаються виключно з білку (трипсин, альдолаза); б. складні (2-компонентні), або холоферменти, складаються з білкової частини-апоферменту, та небілкової (коферменту). Апочастина відповідає за швидкість та специфічність ферменту, а кофермент - яку хімічну речовину каталізує фермент. Коферменти - вітаміни, іони металів.

Властивості ферментів:

- 1) як каталізатори ферменти залишаються відносно незмінними після реакції і можуть знову реагувати з наступними молекулами субстрату;
- 2) ферменти діють в дуже низьких концентраціях;
- 3) це термолабільна сполука. В діапазоні активності температура для дії ферменту $+20^{\circ}$ - $+37^{\circ}\text{C}$. При температурі більше $+50^{\circ}\text{C}$ ферменти інактивуються.
- 4) залежність активності ферментів від рН середовища. Найбільша активність в межах фізіологічних значень рН (тобто близько нейтральній). Є виключення - пепсин працює при рН менше 2;
- 5) специфічність – кожен фермент каталізує тільки одну певну хімічну реакцію;
- 6) оборненість хімічних реакцій – один і той же фермент при певних умовах має властивості каталізувати реакцію як в сторону синтезу так і в сторону розщеплення цієї сполуки;
- 7) залежність від концентрації ферменту та субстрату. Від концентрації ферменту залежність прямо пропорційна, а концентрація субстрату - до певної межі прямо пропорційний, а потім ріст швидкості реакції знижується;
- 8) залежність речовин від наявності в реакції суміші активаторів та інгібіторів. Активатори – речовини, що стимулюють ферментативну активність (іони металів, ферменти (аутоактивація), певні кислоти (солянка активує пепсин). Інгібітори – речовини, що гальмують швидкість реакції (солі важких металів, кислоти та ін).
- 9) термолабільність ферментів. Проявляють максимум активності в межах t 20 – 37°C . При зниженні температури їх активність падає, а при більших за 50°C ферменти, як і всі білки денатурують.

Локалізація ферментів. Ферменти, за деяким виключенням, локалізуються в клітинах, входячи в структуру клітинних органел, таких як ядро, мітохондрії (окислювально-відновні ферменти); рибосоми (ферм. біосинтезу білку);

лізосоми (протеолітичні ферменти); цитоплазма (гліколітичні ферменти). Виключення складають ферменти шлунково-кишкового тракту, які виділяються у просвіт харчотравних органів у момент перетравлення корму та ферменти системи зсідання крові, які функціонують у кровоносних судинах. Внутріклітинні ферменти при пошкодженні клітинних структур внаслідок запальних процесів та інших патологій, коли порушується нормальна проникливість клітинних мембран, або ж за рахунок зруйнування самих клітин, посилено виходять і потрапляють у кров. Саме в цей час лабораторно і визначається їх підвищена активність в периферійній крові. При розвитку некротичних процесів показовим, інформативним може бути дослідження активності кислої фосфатази, яка локалізується глибоко в клітині, а саме в лізосомах. Чим більше вогнище некротичного ураження, тим більшим буде значення активності кислої фосфатази в крові. Дуже цікавий і тест а-глютамілтранспептидазу (α -ГТП). Цей фермент каталізує транспорт амінокислот через мембрани клітин. Підвищення його активності при захворюваннях свідчить про активізацію репаративних процесів, а отже, про активність одужання тварини. Активність ферментів в крові може підвищуватись не тільки за рахунок їх підсиленого виходу через пошкоджені клітинні структури, але й в наслідок патологічних станів, котрі супроводжуються підвищеним біосинтезом цих ферментів.

За діагностичною цінністю ферменти підрозділяються на 2 групи:

1) неспецифічні ферменти (каталізують реакції майже в усіх органах і тканинах), коливання активності інших ферментів як діагностичний тест малоінформативні.

2) органоспецифічні ферменти - це ферменти, що каталізують хімічно перетворені характерні для одного, або небагатьох органів. Зміна активності таких ферментів є ознакою патологічного процесу в конкретному органі. (наприклад, ферменти серцевої та скелетної м'язової тканини – креатинфосфокіназа. При деструктивних процесах в м'язовій тканині (інфаркті міокарду і м'язовій дистрофії) її активність значно підвищується; перевищення активності АЛТ над АСТ свідчить про наявність початкових стадій гепатиту, і в той же час подальше перевищення активності АСТ над АЛТ є сигналом ускладнення гепатиту і переходу його у деструктивну фазу, у цироз. Це пояснюється різною локалізацією цих ферментів. Якщо АЛТ локалізується в цитоплазмі гепатоцитів і виходить в кров уже при початкових стадіях порушення через мембрани цих клітин, то АСТ локалізується в мітохондріях і виходить в кров при більш глибоких ушкодженнях клітин печінки). Методи визначення ферментів в біологічному матеріалі мають свою специфіку, обумовлену дуже низькою концентрацією ферментів.

Кількість ферментів розраховують по швидкості реакції, що каталізує досліджуваний фермент. Ця швидкість пропорційна кількості перетвореного субстрату, або по кількості утвореного продукту реакції. Тобто визначається не концентрація самого ферменту, а його активність. Активність ферменту позначають кількістю перетвореного субстрату в перерахунку на 1 літр біологічного матеріалу за одиницю часу. За міжнародну одиницю активності ферменту (Е) прийнято рахувати таку кількість ферменту, яка за оптимальних умов каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хвилину (мкмоль/хв.) В міжнародній системі одиниць (СІ) за одиницю активності ферменту прийнятий КАТАЛ (кат), що відповідає кількості ферменту, що перетворює 1 моль субстрату за 1 секунду (моль/сек.). Це велика одиниця, і в практиці застосовують мікро- та нанокатали. Співвідношення (Е) і (кат) таке: $1\text{Е} = 16,67\text{ нкат}$.

Ензимодіагностика.

Розвиток діагностичної ензимології переважно йде за двома перспективними напрямками медичної ензимології:

- 1) використання ферментів у клініко-діагностичних лабораторіях у якості реагентів для визначення концентрації речовин у біологічних рідинах;
- 2) аналіз кінетики появи й зникнення ферментів у крові

Отже, перший напрямок - використання ферментів як селективних реагентів для відкриття й кількісного визначення нормальних або аномальних хімічних речовин у сироватці крові, сечі, шлунковому соку тощо (наприклад, визначення концентрації глюкози, білка за допомогою ферментів). Частіше за все в якості матеріалу для дослідження використовується сироватка крові, ферментний склад якої відносно сталий і має різне походження.

Переваги ферментативних методів дослідження:

- висока точність;
- специфічність;
- чутливість;
- простота проведення аналізу;
- значне скорочення часу дослідження;
- часто, відсутність необхідності побудови калібрувальних графіків

Перспектива розвитку даного напрямку - спрощення й раціональна модифікація методів, які вже випробувані та застосовуються, уніфікація аналітичних методів виявлення компонентів.

Для розв'язання даного завдання широко застосовуються наступні методи: спектрофотометричні (колориметричні), флюорометричні, метод імуноферментного аналізу.

Так само при визначенні активності ферментів можуть застосовуватись інші методи, такі як: поляриметрія, потенціометрія та кондуктометричні методи вимірювання. Визначення активності можна виконувати, використовуючи методи хроматографії та електрофорезу. Ці методи високочутливі і специфічні, що робить їх у багатьох випадках незамінними; вони дозволяють значно скоротити витрату ферменту на вимірювання активності, але не завжди застосовуються, зважаючи на тривалість проведення самої методики (хроматографія, електрофорез).

Метод імуноферментного аналізу (ІФА)

Для раннього виявлення хвороби та моніторингу її течії, контролю за ефективністю лікування та виявлення рецидивів у ранні строки, широко застосовують високо надійні імуноферментні методи аналізу

Загальною відзначною рисою імуноферментного аналізу є те, що в якості індикаторної молекули, що дозволяє слідкувати за імунним комплексом, використовується молекула ферменту. Відомо, що фермент може модифікувати не одну молекулу субстрату, а декілька. Це робить метод ІФА дуже чутливим. Іноді вона вища за чутливість інших методів (РІА, імунофлюоресцентних).

Історія винаходу ІФА-методів починається з того часу, коли біохіміки почали ковалентно пришивати (іммобілізувати) молекули ферментів до молекул білків. І особливо – до імуноглобулінів. Однак, тільки через п'ять років кропіткої праці ми отримали методи ІФА у тому вигляді, що маємо зараз.

Метод ІФА базується на двох принципах:

1– властивість ферментів та антитіл зберігати свою функціональну активність навіть у зв'язаному з твердою основою вигляді (не має значення зв'язок ковалентний чи не ковалентний).

Процедура пришивання не повинна змінювати імунні властивості фермент-міченого учасника реакції. Виявляти імунний комплекс зручно, використовуючи здатність ферменту розщеплювати субстрат, який змінює колір під час реакції. В такому разі використовують спектрофотометрію. Імунний комплекс можна виявляти як в розчині, так і при адсорбції чи ковалентній іммобілізації на твердому носії.

2 – можливість створювати комплекс антитіло-фермент (At-F) у кон'югованому вигляді, який зберігає свою біологічну активність у розчині.

Існує декілька модифікацій ІФА:

1. ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) – метод визначення за допомогою імуносорбентів, зв'язаних з ферментами;

2. EIA (enzyme immunoassay) - метод на основі фермент-імуновизначення;

3. ЕМІТ (enzyme multiplied immunoassay technique) - спосіб, заснований на зв'язку ферменту з декількома імунними агентами.

Вони поділяються на два принципово різних типи ІФА – гомогенний (ЕМІТ) та гетерогенний (ELISA и EIA). Гетерогенний ІФА іноді називають твердофазним – тІФА.

Гомогенний ІФА (gIФА) найпростіший в методичному відношенні. При його постановці один з учасників (низькомолекулярний агент) помічають ферментом. Далі спостерігають за формуванням комплексу. Зміни активності ферменту реєструють.

гІФА має низку переваг перед іншими імунохімічними методами:

- по-перше, його відзначає висока експресія. За допомогою гІФА визначення потребує кількох хвилин;

- по-друге, метод має одну стадію і не потребує трудомістких та потребуючих часу етапів промивки;

- по-третє, метод потребує мінімальних об'ємів біологічного та клінічного зразків.

Однак, гІФА-метод має один недолік. Антитіло може ефективно екранувати або модифікувати зв'язану з ним молекулу ферменту тільки при взаємодії з низькомолекулярним антигеном. Тому, на засадах гІФА можливе створення діагностичних тест-систем тільки для низькомолекулярних антигенів.

Для визначення широкого класу речовин: гормонів, онкомаркерів, лікарських препаратів у крові хворого, наркотиків, бактерій, вірусів та антитіл застосовують твердофазний метод – тІФА.

Гетерогенний ІФА (mIФА)

Загальні принципи методу mIФА

Визначення антитіл

Принцип методу не залежить від виду біологічного субстрату організму (сеча, кров, слина), в якому проводять визначення.

На тверду поверхню планшету (тверда фаза) сорбують антигени будь-якого інфекційного агенту (фрагмент бактерії, вірусу тощо). На першій стадії в це вічко вносять піддослідний матеріал (сироватка крові хворого).

Якщо в ній містяться антитіла до інфекційного агенту, то вони закріплюються на відповідних антигенах. При промиванні вони залишаються зв'язаними.

На другій стадії аналізу до вічка вносять антитіло із заздалегідь прикріпленим ферментом. Цей комплекс здатен зв'язувати антигени людини, що закріпилися на інфекційному агенті – так званому кон'югаті. Якщо у вічку

присутні імунні комплекси, що утворилися на першій стадії, то виникає молекулярний ланцюг. На його кінці знаходиться фермент.

На наступній стадії до вічка додають безбарвний розчин хромогену. Фермент з молекулярного ланцюга розщеплює хромоген і той отримує забарвлення. Забарвлений комплекс утворюється тільки за умови присутності у вічку усіх компонентів ланцюга. Якщо імунні комплекси на першій стадії не виникають, то інші частини молекулярного ланцюга теж відсутні. Тому хромоген не буде забарвлювати розчин.

Специфічні антитіла із сироватки крові хворого до інфекційного агенту відіграють ключову роль у цій реакції. Методом тІФА ми аналізуємо здатність деяких антитіл у піддослідному матеріалі зв'язуватися з антитілами, що нас цікавлять.

На результати аналізу суттєво впливають властивості самої тест-системи – ступінь очистки, кількість антигенів, що доступні для утворення імунних комплексів, та особливості імунної відповіді хворого. До того ж багато залежить від виду антигену, який сорбують на тверду фазу.

Позитивний результат тесту свідчить тільки про наявність у зразку антитіл, здатних зв'язуватися з поверхневими антигенами, закріпленими на твердій фазі.

Визначення антигенів

Для визначення антигенів, що є інфекційними агентами, використовують іншу модифікацію тІФА. В цьому випадку на тверду фазу (поверхню планшету) сорбують антитіла до піддослідного агента. Утворюється реакційний ланцюг: антитіло → реакційний агент → антитіло + фермент. Якщо у зразку наявний антиген, то утворюється імунний комплекс.

Фермент, що присутній у вічку, здатен розщеплювати хромоген з утворенням забарвленого продукту. Це стає можливим тільки за умови повного ланцюга. Якщо у зразку дослідний антиген відсутній, то ланцюг не утворюється і хромоген не забарвлюється.

Наявність специфічних антитіл до дослідних антигенів не відображає стану загального імунного статусу. Динаміка змін концентрації специфічних антитіл тим більш не відображає ефективність терапії чи зберігання в організмі інфекційного агента. Отже, методом тІФА ми визначаємо тільки наявність у системі антигену, що може зв'язуватися.

Індикаторні методи аналізу дозволяють:

- Встановити стадію хвороби;
- Контролювати перебіг захворювання та прогнозувати його кінець;
- Встановлювати показники до вакцинації та контролювати її ефективність;
- Визначати критерії безпеки крові та її препаратів;

- Виявляти гострі та хронічні форми вірусних гепатитів;
- Встановити етіологію вірусних гепатитів А, В, С, D, Е та їх асоційовані форми (вірусологічний діагноз вірусних гепатитів С та Е має бути тільки приблизний);
- Визначати ризик передачі інфекції від матері до плоду.

За фізико-хімічними характеристиками тІФА дуже схожий на твердофазний РІА. Відмінності стосуються лише індикаторних молекул – у тІФА це фермент, а у тРІА це радіоактивні ізотопи. Інші принципи співпадають – в обох методах використовується тверда матриця, на яку сорбують імунний комплекс; ідентичний також спосіб видалення компонентів, що не увійшли до комплексу.

Найбільш широко визначаються ферменти у крові, менше - у сечі. У кров надходять ферменти з органів, в яких відбуваються патологічні процеси, що пов'язані з порушенням функцій і особливо структури клітин. Так при запаленнях, коли відбувається деструкція тканин, у кров виходять в значній мірі протео- та гліколітичні ферменти. Все це змінює швидкість реакцій синтезу та розщеплення, а також підвищує проникність клітинних мембран та проникність бар'єрів і вихід метаболітів з клітин і органів. В цих умовах можуть з'явитися ферменти, яких в крові в нормі не виявлено.

Оскільки різні органи характеризуються особливостями, що до асортименту ферментів, то при захворюванні цих органів у кров потрапляють ферменти, які є характерними для даного органу (саме тому ферментні методи діагностики мають особливе значення при злоякісних пухлинах).

Серед ферментів, які можуть бути у крові, найбільше значення аспартатамінотрансфераза (АСТ), аланінамінотрансфераза (АЛТ), альдолаза, альфа-амілаза, лужна та кисла фосфатаза.

При гепатиті значно підвищується в крові активність АЛТ, а при інфаркті міокарду переважає тенденція до зростання АСТ.

При багатьох захворюваннях м'яза серця (зокрема при інфаркті), в крові підвищується активність амінотрансфераз та альдолаз. Для інфаркту характерне зниження активності ацетілхолінтрансферази (зокрема на перших етапах захворювання). Характерною ознакою інфаркту є підвищення активності ферменту креатінази, що каталізує процес перенесення залишків фосфорної кислоти.

Активність трансамілаз та альдолаз змінюється і при злоякісних пухлинах. При пошкодженні або порушенні остеопоезу кісток спостерігається підвищення фосфатаз в крові (зокрема лужної та кислої).

При гострих панкреатитах важливе діагностичне значення має визначення активності альдолази, яка в перший (доклінічний) період значно підвищується.

Встановлено, що однією з дуже характерних ознак захворювання печінки є поява в крові ферменту орнітин-карбомойлтрансферази. Він каталізує процес перенесення на орнітин залишку карбамінової кислоти.

Рядом досліджень доведено, що наявність в крові ферменту орнітинкарбомойлтрансферази можна виявити запальні процеси в печінці, а за наявністю ферменту креатинкінази – захворювання серцевого м'яза навіть в тих випадках, коли інші методи не виявляють порушення стану цих органів.

Зміни всього комплексу ферментів, в тому числі і їх ізоферментів, при ряді досліджень досить тонко і точно відображають стан патологічного процесу, особливості його перебігу, а часто і можливі наслідки.

Такий показник можна розглядати як ензиматичний синдром, що становить частину більш широкого поняття, яке в клініці має назву біохімічного синдрому.

Отже визначення вмісту ізоферментів в крові та їх активності є одним з дуже тонких специфічних методів діагностики.

Ферментні препарати використовують у такій галузі клінічної біохімії, як ферментний аналіз, у якості дуже чутливих реактивів для визначення наявності та концентрації деяких речовин в біологічних пробах.

Зокрема, препарат ферменту глюкозооксидази, який окислює глюкозу за рахунок кисню повітря, застосовують у клініці для визначення невеликих, слідових кількостей глюкози в пробах біологічних рідин при патологіях.

Завдяки високій чутливості і специфічності глюкозооксидази її використовують також для виготовлення індикаторного паперу (тестпапір) при експрес методах виявлення глюкози.

На підставі даних ензимопатології та ензимодіагностики розроблено ряд методів сучасної ензимотерапії.

Ферментотерапія проводиться переважно в двох напрямках:

а) введення ферментів (або коферментів) у тих випадках, коли їх не вистачає в організмі;

б) застосування ферментів, як допоміжних засобів при деяких захворюваннях.

Так, нестача ферментів у шлунково-кишковому тракті пов'язана із зменшенням секреції травних соків, може бути компенсована призначенням такої хворій тварині (собаки, коти) ферментного препарату, наприклад пепсину з соляною кислотою. Нестача панкреатичних ферментів може бути компенсована введенням їх у капсулах, (наприклад, трипсину), щоб запобігти інактивації ферменту під впливом кислого шлункового соку. б) Як допоміжні терапевтичні засоби використовують, наприклад, трипсин і химотрипсин – для обробки некротичних ран, опіків, гангренних уражень, ділянок запалень – з метою розщеплення білків загнених кітин, а також для відторгнення фібрінових

плівок з плевральної порожнини. Використовують також фермент гіалуронідазу, який розщеплює гіалуронові кислоти і вприсяєпроникливості сполучної тканини

ТЕМА 3. ІЗОФЕРМЕНТИ ТА ЇХ РОЛЬ У ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ

1. Походження ферментів сироватки крові:

- Лактатдегідрогеназа (ЛДГ).
- Креатинкіназа (КК)
- Лужна фосфатаза (ЛФ)
- Кисла фосфатаза (КФ)
- γ -Глутамілтрансфераза (ГГТ)
- Холінестераза (ХЕ)
- Аспартатамінотрансфераза (АсАТ)
- Аланінамінотрансфераза (АлАТ)
- α -Амілаза
- Алкогольдегідрогеназа (АДГ)
- Альдолаза (АлД; фруктозо-1,6-фосфатаальдолаза)
- Гексокіназа (ГК)
- Каталаза (КА)
- Лейцинамінопептидаза (ЛАП)-

Походження ферментів сироватки крові.

Ізоферменти - це ізоформи або ізотипи одного і того ж ферменту, які каталізують одну і ту ж реакцію, але відрізняються за первинною структурою. Вони містяться в одному організмі, але, як правило, в різних його клітинах, тканинах або органах.

Склад і співвідношення форм ізоферментів (спектр ізоферментів) змінюється в залежності від їх локалізації в органах і тканинах організмів одного виду і навіть у різних субклітинних органелах однієї і тієї ж клітини. На спектр ізоферментів також можуть впливати фізіологічний стан організму та патологічні процеси, що відбуваються в ньому. Оскільки ізоферменти розрізняються за своїми властивостями, то характер їх розподілу відображає регуляторні механізми, що контролюють метаболізм.

Прикладом ферменту, що має ізоферменти, є гексокіназа, яка має чотири ізотипи, що позначаються римськими цифрами від I до IV. При цьому один з ізотипів гексокінази, а саме гексокіназа IV, експресується майже виключно в печінці і має особливі властивості, зокрема її активність не пригнічується продуктами її реакції – глюкозо-6-фосфатом. Ще одним прикладом ферменту,

що має ізоферменти, є амілаза. Панкреатична амілаза відрізняється за первинною структурою та фізико-хімічними властивостями від амілази слинних залоз, кишківника та інших органів. Ця особливість була використана для розробки та застосування більш надійного методу діагностики гострого панкреатиту шляхом визначення не загальної амілази плазми крові, а саме панкреатичної ізоамілази.

Для дослідження спектру ізоферментів використовують наступні методи: іонообмінну хроматографію, гель-фільтрацію, електрофорез та ізоелектрофокусування, а також іммунохімічні методи з використанням антитіл. Найчастіше використовується дискелектрофорез в поліакриламідному гелі.

Як відзначалося раніше, ферментний аналіз найчастіше проводять у плазмі крові. Ферменти, які виявляються в нормі в плазмі або сироватці крові, умовно можна розділити на 3 групи: секреторні, екскреторні та індикаторні.

1. *Секреторні ферменти* синтезуються певними органами, здебільшого печінкою, потім виділяються в плазму крові, де виконують свою фізіологічну функцію. Прикладом таких ферментів є сироваткова холінестераза, більшість факторів системи згортання крові.

2. *Екскреторні ферменти* синтезуються також, головним чином, у печінці. Прикладом таких ферментів є: лейцинамінопептидаза, лужна фосфатаза та інш. У фізіологічних умовах ці ферменти, в основному, виділяються з жовчю. При багатьох патологічних процесах виділення екскреторних ферментів з жовчю порушується, а активність у плазмі крові підвищується.

3. *Індикаторні ферменти* попадають у кров із тканин, де вони виконують певні внутрішньоклітинні функції. Більша частина індикаторних ферментів у сироватці крові визначається в нормі в слідових кількостях. При ураженні тих або інших тканин ферменти із клітин "вимиваються" у кров; їхня активність у сироватці різко зростає, і служить індикатором ступеню й глибини ушкодження цих тканин.

Особливий інтерес для клініки представляє дослідження активності індикаторних ферментів у сироватці крові. Зростання активності ферментів сироватки крові при багатьох патологічних процесах пояснюється, насамперед, двома причинами:

1) виходом у кров'яне русло ферментів з ушкоджених ділянок органів або тканин;

2) підвищенням каталітичної активності ферментів, що переходять у кров.

У сучасних клінічних лабораторіях проводять дослідження в крові таких індикаторних ферментів як: лактатдегідрогенази, креатинкінази, аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, α -амілази, γ -глутамілтрансферази, холінестерази, кислої та лужної фосфатази,

глутаматдегідрогенази, альдолази, ліпази, аланінамінопептидази, глюкозо-6-фосфатази, аргінази, сорбітолдегідрогенази, алкогольдегідрогенази та інш.

Лактатдегідрогеназа (ЛДГ)

Лише в деяких лабораторіях зараз визначають загальну активність ЛДГ через відсутність її тканиноспецифічності. Підвищення її активності спостерігається при широкому спектрі патологічних станів, таких як гостре ураження печінки, скелетних м'язів, нирок, а також при мегалобластних та гемолітичних анеміях. Також, у пацієнтів з лімфомою, наприклад, висока активність ЛДГ у плазмі є вказівкою на поганий прогноз. Послідовні виміри активності ЛДГ можуть бути інформативними для контролю ефективності лікування, так як існує кореляція між активністю ферменту й обсягом пухлини.

Визначення активності ізоферментів ЛДГ може бути результативним при підозрі на інфаркт міокарда й у діагностиці гемолітичного кризу при серповидно-клітинній анемії. Як у серцевому м'язі, так і в еритроцитах ЛДГ представлена головним чином ізоферментом ЛДГ₁ (H4). Останній проявляє набагато більш високу каталітичну активність у відношенні α -гідроксibuтирату (ніж лактату) у порівнянні з іншими ізоферментами. Даний ізофермент ЛДГ має другу назву - α -гідроксibuтиратдегідрогеназа і для визначення його активності звичайно використовують саме цей субстрат.

ЛДГ₁ має тривалий час напівжиття в плазмі. Після інфаркту міокарда її активність повільно підвищується, досягає піка через 2-3 дня, а потім знижується протягом тижня або довше. Оскільки даний ізофермент присутній в еритроцитах, його активність підвищується після легеневої емболії, яка може нагадувати за клінічними ознаками інфаркт міокарда. Слід приймати до уваги, що наявність гемолізу зводить нанівець діагностичну цінність виміру активності α -гідроксibuтиратдегідрогенази у разі діагностики інфаркту міокарду.

У тканині печінки найбільшу активність мають ізоферменти ЛДГ₄ та ЛДГ₅. При паренхіматозному гепатиті у сироватці крові суттєво зростає активність ізоферментів ЛДГ₄ і ЛДГ₅ та зменшується активність ЛДГ₁ і ЛДГ₂.

Креатинкіназа (КК)

Активна молекула КК являє собою димер: два мономери, М та В, утворюють три ізоферменти - ВВ, ММ та МВ. Ізофермент ВВ локалізований переважно в головному мозку (від англ. brain – мозок). У нормі його активність у плазмі дуже низка, і навіть при серйозному ушкодженні мозку, наприклад інсульті, вона майже не підвищується.

Більша частина активності креатинкінази плазми представлена ізоферментом скелетних м'язів ММ (від англ. muscle – м'яз). Підвищення його

концентрації в плазмі крові можливе при ушкодженні скелетних м'язів або при важкому та тривалому фізичному навантаженні.

Креатинкіназа серцевого м'яза містить значно більше ізоферменту МВ (приблизно 30%), ніж скелетні м'язи (менш 1%). Підвищена концентрація КК у плазмі крові характерна для інфаркту міокарда, і за відсутності ушкоджень скелетних м'язів, немає необхідності в окремому визначенні ізоферменту МВ. Однак, якщо у хворих з підозрою на інфаркт міокарда, який трапився за фізичним навантаженням, травмою або внутрішньом'язовою ін'єкцією (усі впливи можуть підвищувати активність КК), слід визначати активність ізоферменту МВ. Якщо активність ізоферменту МВ перевищує 5 % від загальної активності КК, ураження міокарду можна вважати підтвердженим

Лужна фосфатаза (ЛФ)

Лужна фосфатаза міститься у великій кількості у печінці, кістках (зокрема в остеобластах), плаценті й кишковому епітелії. Кожна із цих тканин має специфічні ізоферменти ЛФ. Вона каталізує відщеплення фосфорної кислоти від її органічних сполук. Оптимум рН лужної фосфатази лежить в лужному середовищі (рН 8,6-10,1). Фермент локалізований у клітинній мембрані.

Фізіологічне збільшення активності ЛФ спостерігається:

- при вагітності за рахунок плацентарної ізоформи ферменту;
- у дитячому віці, коли відбувається ріст кісток - за рахунок кісткового ізоферменту.

Концентрація ферменту в плазмі крові висока при народженні, але потім швидко знижується, проте вона залишається підвищеною в 2-3 рази у порівнянні з нормальним рівнем у дорослих. Концентрація підіймається знову під час підліткового прискорення росту кісток. По мірі припинення росту кісток вона знижується до нормального рівня дорослих людей. Активність ЛФ плазми крові практично здорових людей похилого віку трохи вища норми. Це може пояснюватися високою частотою розвитку легкої форми хвороби Педжета у літніх людей.

Підвищення активності ЛФ спостерігається найчастіше при холестатичній хворобі печінки та при деяких захворюваннях кісток. При холестази складові жовчі індукують ЛФ, результатом цього є підвищений вміст ферменту. Кісткова лужна фосфатаза продукується остеобластами – крупними одноядерними клітинами, що знаходяться на поверхні кісткового матриксу в місцях інтенсивного формування кісток. Завдяки позаклітинному розташуванню ферменту в процесі кальцифікації можна прослідити прямий зв'язок між захворюванням кісток і підвищенням активності ферменту в сироватці крові.

Збільшенням активності лужної фосфатази супроводжується хвороба Педжета, рахіт будь-якої етіології, кісткові зміни, пов'язані з гіперпаратиреозом.

Активність ЛФ не зростає при неускладненому остеопорозі, якщо тільки цей стан не ускладнюється колапсом або переломом кістки. Концентрація ЛФ у плазмі звичайно підвищується при злоякісних пухлинах, які мають кісткове або печінкове походження. Описані також пухлиноспецифічні форми ЛФ, які секретуються пухлинними клітинами. Найбільш відомим з них є ізофермент Регана, який подібний за термостабільністю до плацентарної ЛФ і може виявлятися при бронхіальній карциномі.

Активність ЛФ часто вимірюють як елемент "біохімічного профілю", при цьому нерідко виявляється її підвищення за відсутності клінічних проявів захворювання кісток або печінки. Для встановлення причини такого підвищення слід спробувати виявити тканину, ушкодження якої привело до виділення в кров ферменту. Це можна зробити двома способами:

- визначити тканиноспецифічні ізоферменти ЛФ (наприклад, за допомогою електрофорезу або диференційної теплової інактивації);
- визначити активність γ -глутамілтрансферази в плазмі крові (фермент, що міститься в печінці, але відсутній в кістках). Його підвищена активність у плазмі часто (але не завжди) супроводжується підвищеною активністю печінкової ЛФ.

Кисла фосфатаза (КФ)

Кисла фосфатаза - це фермент, який каталізує гідроліз ортофосфорних моноефірів з відщепленням фосфатної групи. Він проявляє оптимальну активність в кислому середовищі. Під найменуванням "кисла фосфатаза" мають на увазі всі фосфатази, що проявляють найвищу активність при $\text{pH} < 7,0$. Ці ферменти знаходяться у клітинах різних тканин, здебільшого у лізосомах, але можуть бути і поза ними.

Високі концентрації КФ визначаються у передміхуровій залозі, і тому підвищена концентрація цього ферменту в плазмі крові спостерігається у деяких пацієнтів з раком передміхурової залози. Його значення в діагностиці даного захворювання невелике, тому що активність ферменту в плазмі зростає тільки приблизно у 20 % хворих, у яких пухлина обмежується залозою. Однак при наявності метастазів активність ферменту збільшується у 80 % хворих. Активність КФ підвищена також у деяких випадках простатиту та при доброякісній гіпертрофії передміхурової залози. Фермент нестабільний, тому зразки крові для аналізу слід передавати в лабораторію швидко, а сироватку піддавати глибокому заморожуванню до виконання аналізу. Оскільки фермент міститься у еритроцитах, гемоліз зводить нанівець значимість визначення активності КФ. Ізофермент передміхурової залози специфічно інгібується тартратом, але не чутливий до дії формальдегіду. У більшості лабораторій кисла фосфатаза вимірюється як простатспецифічний "тартратлабільний" або "формолстабільний" ізофермент.

Фермент міститься також у клітинах печінки, селезінки, еритроцитах, тромбоцитах та кістковому мозку. Активність КФ сироватки крові в нормальних умовах у чоловіків приблизно наполовину складається з активності простатичної фосфатази, решта - пов'язана з ферментом, що надходить з печінки та зруйнованих тромбоцитів і еритроцитів. У жінок КФ сироватки надходить переважно з печінки, еритроцитів і тромбоцитів. Високі концентрації непростатичної кислої фосфатази можуть спостерігатися при хворобах кісток (хвороба Педжета), тромбоцитемії (хвороба Гоше - спадкове порушення депонування ліпідів).

γ-Глутамілтрансфераза (ГГТ)

γ-Глутамілтрансфераза – це мікросомальний фермент, що бере участь в обміні амінокислот. Каталізує перенесення γ -глутамільного залишку з пептиду, що містить кінцевий глутаматний залишок (глутатіон), на амінокислоту, інший пептид, або іншу субстратну молекулу. Найбільша активність ферменту виявляється у нирках (у 7000 разів вище, ніж в сироватці крові), печінці (в 200-500 разів вище, ніж в сироватці крові) і підшлунковій залозі. Значно нижча активність ГГТ визначається в кишечнику, мозку, серці, селезінці, простаті. У клітині фермент міститься в плазматичній мембрані, лізосомах та цитоплазмі. Мембранна локалізація ГГТ характерна для клітин з високою секреторною, екскреторною або реабсорбційною активністю.

Незважаючи на те, що активність ферменту найбільш висока в нирках, джерелом сироваткової активності ГГТ є переважно гепатобіліарна система. Відвищення рівня ГГТ в сироватці - найбільш чутливий лабораторний показник при захворюваннях гепатобіліарної системи, тому використовується у якості маркера холестазу.

Активність ГГТ сироватки зростає при всіх формах захворювань печінки. Вона найбільш висока у випадках обструктивних уражень печінки (підвищення в 5-30 разів від нормальних значень). Цей показник патології печінки є більш чутливим, ніж аланінамінотрансфераза та аспартатамінотрансфераза при діагностиці механічної жовтяниці, холангітів та холециститів. Підвищення ГГТ в цих випадках спостерігається раніше і зберігається довше, ніж інших печінкових ферментів.

При гострому та хронічному панкреатиті, а також у випадках злоякісних захворювань підшлункової залози, активність ферменту може перевищувати норму в 5-15 разів. Збільшені рівні ГГТ спостерігаються у сироватці пацієнтів з алкогольним цирозом і у більшості людей, що зловживають алкоголем. Тому ГГТ використовують як індикатор захворювань печінки, викликаних алкоголем. Активність ГГТ може залишатися підвищеною в плазмі крові протягом 3-4 тижнів утримання від алкоголю, навіть за відсутності ураження печінки.

Холінестераза (ХЕ)

У тканинах людини виявлено два різні ферменти цього типа: ацетилхолінестераза («дійсна» холінестераза), яка переважно знаходиться в нервовій тканині, скелетних м'язах і в низькій концентрації в еритроцитах; і сироваткова, або псевдохолінестераза, яка міститься в печінці, підшлунковій залозі, секретується печінкою в кров. Сироваткова ХЕ є ферментом, що каталізує реакцію гідролізу ацетилхоліну.

Визначення ХЕ в клінічних дослідженнях використовується, насамперед, для діагностики можливого отруєння фосфорорганічними отруйними речовинами, інсектицидами, а також як показник стану білково-синтезуючої функції печінки. Крім того біохімічний аналіз крові на ХЕ використовується для оцінки ризику ускладнень при хірургічних втручаннях.

Вміст ферменту ХЕ в крові людини починає різко знижуватися при важких хронічних захворюваннях печінки, особливо при цирозі. Низький рівень активності ХЕ в крові — ознака таких захворювань, як: цироз, гепатит, гостре отруєння інсектицидами, інфаркт міокарду, метастатичний рак печінки та інші онкологічні захворювання. Слід приймати до уваги те, що зниження рівня ХЕ відбувається також на пізньому терміні вагітності, після хірургічного втручання і при вживанні деяких медичних препаратів: оральних контрацептивів, глюкокортикоїдів.

Підвищений рівень активності ХЕ крові може бути симптомом наступних захворювань: артеріальна гіпертонія, нефроз, рак молочної залози, ожиріння, алкоголізм, цукровий діабет тощо. Підвищення рівня ХЕ відбувається на початковому етапі вагітності.

Аспартатамінотрансфераза (АсАТ)

АсАТ - внутрішньоклітинний фермент, який каталізує зворотнє перенесення аміногрупи з аспарагінової кислоти на α -кетоглутарову кислоту з утворенням оксалоацетату та глутамату. Переамінування відбувається за участю кофермента піридоксальфосфата (похідного вітаміну В₆). АсАТ в клітинах представлена двома ізоферментами - мітохондріальним і цитоплазматичним (близько 1/3 загальної внутрішньоклітинної активності АсАТ локалізується в цитоплазмі клітини, 2/3 - в мітохондріях). Найбільша концентрація цього ферменту визначається в міокарді, печінці, скелетній мускулатурі, нирках, в менших концентраціях АсАТ міститься в підшлунковій залозі, селезінці, легенях та еритроцитах. У міокарді активність АсАТ в 10000 разів вища, а в еритроцитах - в 10 разів більша, ніж в сироватці крові.

Активність АсАТ в сироватці крові підвищується при ураженні (але не при порушенні функції) органів і тканин з високим вмістом цього ферменту. Найбільш різкі зміни в активності АсАТ спостерігаються при ураженні

серцевого м'яза. При інфаркті міокарду активність АсАТ в сироватці крові може підвищуватися в 2-20 разів, причому підвищена активність виявляється ще до появи типових ознак інфаркту на ЕКГ. Встановлено кореляцію між розмірами некрозу в серцевому м'язі та рівнем АсАТ в сироватці крові. Важлива також є прогностична цінність визначення активності АсАТ: якщо на 3-4 день захворювання активність цього ферменту не знижується, то прогноз поганий. Наростання активності може свідчити як про розширення осередка інфаркту, так і про залучення до процесу інших органів і тканин - наприклад, печінки. При стенокардії активність АсАТ, як правило, залишається в межах норми, лише при важкій формі коронарної недостатності в перші 24 години активність АсАТ підвищується і нормалізується на 2-3 день після нападу.

АсАТ підвищується при гострому гепатиті та інших гострих ураженнях печінки. Одночасне визначення активності двох амінотрансфераз (АлАТ та АсАТ) є цінним діагностичним тестом. У нормі співвідношення активностей АсАТ/АлАТ (коефіцієнт де Рітіса) дорівнює $1,33 \pm 0,42$. При захворюваннях печінки це співвідношення знижується до 0,6-0,8, а при захворюваннях серця – різко підвищується.

Аланінамінотрансфераза (АлАТ)

АлАТ каталізує зворотню реакцію перенесення аміногрупи аланіна на α -кетоглутарову кислоту з утворенням пірувату та глутамату. Переамінування відбувається у присутності кофермента піридоксальфосфата. Найбільш висока активність АлАТ виявляється в печінці і нирках, менша - в серці, скелетній мускулатурі, підшлунковій залозі, селезінці, легенях, еритроцитах. При пошкодженні та руйнуванні клітин цих органів АлАТ вимивається у кров'яне русло, що приводить до підвищення її активності в крові.

При вірусних гепатитах міра збільшення активності АлАТ корелює зі ступенем захворювання. У гострих випадках активність ферменту в сироватці крові може перевищувати нормальні значення в 50-100 разів і більше. При вірусному гепатиті підвищення активності ферменту відбувається ще до появи жовтяниці (у 50% пацієнтів - за 5 днів, у 90% - за 2 дні до клінічної маніфестації захворювання). Активність ферменту підвищена і у хворих з безжовтяничною формою захворювання.

При інфаркті міокарду АлАТ в сироватці крові збільшується в значно меншій мірі, ніж АсАТ, оскільки активність АлАТ в кардіоміоцитах значно менша у порівнянні з АсАТ. При інфаркті міокарду рівень АлАТ може бути лише дещо збільшеним або в межах норми. Збільшення вмісту АлАТ в сироватці при інфаркті міокарду може вказувати на розвиток застійних явищ у печінці.

α -Амілаза

α -Амілаза каталізує гідроліз крохмалю, глікогену та деяких інших полісахаридів до мальтози, декстрину і олігосахаридів. Часткове травлення цих полісахаридів починається в порожнині рота під дією амілази слинних залоз (S-тип ферменту) і завершується в тонкому кишківнику під впливом амілази підшлункової залози (Р-тип). Значно нижчу амілазну активність мають яєчники, фаллопієви труби, тонкий і товстий кишківник, печінка, молочні залози в період лактації. За каталітичними властивостями активності ферментів із різних органів суттєво відрізняються один від іншого. α -Амілаза сироватки крові складається, головним чином, з двох ізоферментів: панкреатичного і слинного. Іони Ca^{2+} та Cl^- активують її. Активність α -амілази оптимальна при нейтральних рН 6,8-7,0.

Визначення активності амілази в сироватці і сечі використовується переважно в діагностиці захворювань підшлункової залози. При гострому панкреатиті через 2-12 годин від початку нападу спостерігається скороминуще збільшення активності амілази сироватки; рівень амілази сироватки повертається до норми на 3-й або 4-й день. Зазвичай відбувається 4-6-кратне збільшення рівня з максимумом в період 12-72 години від початку нападу. Проте до 20% випадків гострого панкреатиту можуть протікати при нормальному рівні амілази сироватки, паралельне визначення ліпази збільшує вірогідність його виявлення.

Сироваткова амілаза екскретується з сечею, тому збільшення значень амілази сироватки супроводжується збільшенням кількості амілази в сечі. Активність амілази в сечі при гострому панкреатиті збільшується частіше і більше, ніж активність амілази в сироватці. Зростання значень тримається триваліший період після нападу. Проте, діагностична цінність визначення активності амілази в сироватці вища.

При деяких патологічних станах амілаза (зазвичай S-типу) може утворювати комплекси з імуноглобулінами А і G та іншими високомолекулярними білками плазми (макроамілаземія). Ці комплекси не проходять через мембрану ниркових клубочків. У цьому випадку, хоча вміст амілази в сироватці крові зростає, в сечі визначається нормальна активність ферменту. Невідповідність рівнів сироваткової і сечової активності амілази спостерігається також при нирковій недостатності.

При хронічному панкреатиті поза загостренням активність амілази сироватки і сечі знаходиться на субнормальному рівні. Загострення хронічного панкреатиту супроводжується невеликим збільшенням рівня сироваткової амілази. Гіперамілаземією можуть також супроводжуватися деякі непанкреатичні захворювання: хронічна ниркова недостатність (зниження кліренсу сироваткової амілази), будь-якого роду пошкодження слинних залоз, захворювання жовчного тракту - як результат первинного або вторинного залучення підшлункової

залози. Рівень амілази може бути підвищеним при алкоголізмі, а також при опіковому та травматичному шоці.

Зниження значень активності амілази крові можливе у випадках: недостатність підшлункової залози, виражений муковісцидоз, панкреатектомія, важке ураження печінки.

Алкогольдегідрогеназа (АДГ)

Цинквмістний фермент, каталізуючий НАД-залежне зворотнє окислення етанолу до ацетальдегіду. В сироватці крові здорових людей активність АДГ незначна. Виявлення активності в сироватці крові може служити критерієм виразності гепатоцелюлярного некрозу і, в меншому ступені, внутрішньопечінкового холестазу. Загальна активність підвищується до 130-230мкм/(год.л) при гострому вірусному, медикаментозному та алкогольному гепатитах, в меншій мірі (33-45мкм/(год.л) – при цирозі печінки та обтураційній жовтяниці. У нормі ізоферменти АДГ в сироватці мають наступне відношення: АДГ1 (до 85%) – 75,1±9,5%, АДГ2 – 15,0±0,5%, АДГ3 – 9,9±0,5%. Зміна в спектрі АДГ має диференційно-діагностичне значення: при гострому вірусному гепатиті підвищується АДГ1 (до 85%), при гострому алкогольному гепатиті – АДГ2 (до 32%). При цирозі печінки спектр має наступний вигляд: АДГ1 – 23-28%, АДГ2 – 47-52%, АДГ3 – 21-30%; при обтураційній жовтяниці: АДГ1 – 53,7%, АДГ2 – 40,1%, АДГ3 – 6,2%.

Альдолаза (АлД; фруктозо-1,6-фосфатаьдолаза)

Фермент, що зворотно розщеплює фруктозо-1,6-дифосфат та інші кетогексозо-1-фосфати на тріозофосфати. Нормальна активність в сироватці крові – 0,09 мМ/(год.л) або 1,0-7,5 ОД/л. Загальна активність в сироватці крові АлД підвищується при гострому гепатиті, м'язовій дистрофії Дюшена, дерматоміозиті, поліміозиті, інфаркті тканин, онкологічних захворюваннях печінки, легенів, молочної залози, пухлинах ЦНС, шлунково-кишкового тракту, а також при фізичних навантаженнях. Зростання активності АлД суттєво (у 5-10 разів) та інформативно при м'язових дистрофіях. Розрізняють 3 ізоформи АлД, які містяться у скелетних м'язах, серці, селезінці; АлД-В міститься в печінці; АлД-С виявляється в мозку. В сироватці крові здорових людей міститься 1-2 зони активності ферменту, відповідні АлД-А та АлД-В (слабко виявлені). Підвищення загальної активності при гепатитах відбувається за рахунок збільшення фракції АлД-В. Найбільш суттєві зміни в спектрі АлД відмічаються при менінгіомах та гліомах.

Гексокіназа (ГК)

Фермент, каталізуючий фосфорилювання глюкози, фруктози, маннози та інших гексоз з утворенням відповідно гексозо-6-фосфатів. Незважаючи на значний вміст цього ферменту в тканинах, особливо в печінці і адипоцитах, в

нормі його активність в плазмі практично відсутня. Нормальна активність в еритроцитах – $1,27 \pm 0,2$ ОД/г гемоглобіну або $36,8 \pm 5,2$ ОД/1012 еритроцитів. Появлення в сироватці крові ГК, яка відсутня у здорових людей, можливе при гепатитах, доброякісних та злоякісних пухлинах. Дефіцит ферменту в еритроцитах спостерігається при уродженій несфероцитарній негемолітичній анемії. В еритроцитах людини, в залежності від методу визначення, виявляють – 2-7 фракцій. У гемолізатах, збагачених ретикулоцитами, відмічається специфічна фракція з високою рухливістю.

Глутатіонпероксидаза (ГлуП)

Селенвмісний фермент, який каталізує окислення відновленого глутатіону. Діагностичне значення має рівень активності в еритроцитах (в нормі $30,8 \pm 4,7$ ОД/г гемоглобіну). Можливі міжпопуляційні відмінності активності ГлуП. Активність фермента підвищується при дефіциті глюкозофосфатдегідрогенази та альфа-таласемії, при активації вільнорадикальних процесів (в стадії компенсації) . Знижується: при недостатньому надходженні селену, збільшенні у вдихаюмому повітрі концентрації азоту, залізодефіцитній анемії.

Глутатіонредуктаза (ГлуР)

НАДФ-залежний фермент, який каталізує перетворення окисленого глутатіону у відновлений. Фермент широко розповсюджений в тканинах, найбільша активність виявляється в печінці, нирках, серці та еритроцитах. Нормальна активність в лізаті еритроцитів – 56-62 мМ глут-/мл еритроцитів. Активність еритроцитарної ГлуР підвищена при недостатності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Підвищення активності в сироватці крові відмічається при гепатиті, механічній (підпечінковій) жовтяниці, мієлофіброзі, мегалобластній та серповидно-клітинній анеміях. Зниження активності ферменту (до 25% від норми), за умови відсутності клінічних проявів, спостерігається при низькій забезпеченості організму рибофлавіном.

Активність ГлуР та ГлуП відображає антиоксидантний статус еритроцитів, а також загальну неспецифічну антиокислювальну резистентність організму. Фермент еритроцитів може бути розділений на 2 фракції, одна з котрих відсутня при спадковій недостатності ферменту.

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г-6-ФДГ)

Фермент, який каталізує НАДФ-залежне окислювання глюкозо-6-фосфату до 6-фосфоглюконату. Найбільша активність – в селезінці, лімфатичних вузлах, молочній залозі та еритроцитах. Проба Бернштейна в нормі дає негативну реакцію. Активність Г-6-ФДГ у крові в нормі дорівнює $8,3 \pm 1,6$ ОД/г гемоглобіну або 242 ± 46 ОД/1012 еритроцитів, по методу ВОЗ – 351 ± 61 ОД/1012. Еритроцитарна активність зростає при тиреотоксикозі, введенні тиреоїдних гормонів. Підвищення активності у сироватці крові – після інфаркту міокарда та

інфаркту легеня. Дефіцит Г-6-ФДГ - спадкове захворювання, розповсюджене у американських негрів, мешканців Середземномор'я, Індії, Африки, Південної та Середньої Азії. У залежності від характеру та місця мутації в молекулі ферменту (200 мутантних форм Г-6-ФДГ), клінічні варіанти ензимопатії різноманітні і можуть не виявлятися взагалі, проявлятися епізодичним гемолізом під впливом деяких харчових продуктів (бобові) або лікарських засобів (протималярійні препарати хінолінового ряду, сульфаніламід, сульфони, вітамін К, нафталін), вірусів гепатиту та грипу.

β-глюкуронідаза (Гн)

Фермент, гідролізуючий аліфатичні та ароматичні ефіри глюкуронової кислоти. В нормі в сироватці крові у чоловіків міститься $9,9 \pm 2,6$ мг/(год л) або 0,53МО/л, у жінок – $7,4 \pm 2,3$ мг/(год л) або 0,39МО/л. Підвищення концентрації в крові відбувається при пухлинах та хворобах печінки – інфекційному і токсичному гепатиті, цирозі, а також при карциномі головки підшлункової залози, карциномах кишечника, молочної залози, шийки матки, при вагітності.

Ізоцитратдегідрогеназа (ІДГ)

Фермент, маючий 2 форми коферментної специфічності (НАД- і НАДФ-залежні) і каталізуючий зворотнє окислення ізоцитрату. НАДФ-залежна форма присутня в багатьох тканинах (більше – в печінці, серці, скелетних м'язах). Нормальна активність у сироватці - 1,2-7,0ОД/л (оптичний тест – 340нм). Підвищення активності – при вірусному, токсичному та хронічному гепатиті, метастазах в печінці, цирозі, обтураційній жовтяниці, гострому запаленні жовчних протоків, інфекційному мононуклеозі. При активному хронічному гепатиті активність ІДГ в 3-5 разів перевищує верхню межу норми.

Каталаза (КА)

Гемовміщуючий фермент, який здійснює двохвалентне розкладання перекису водню до кисню та води. Максимальний вміст КА виявлено в еритроцитах. Нормальна активність в крові складає до 382МО/мл або 18,4-25,0мкОД/еритроцит або $22,6 \pm 0,5$ мКАТ/л сироватки. Підвищення активності – при бета-таласемії, деяких пухлинах, посиленні перекисних процесів (на стадії компенсації). Зниження активності – при залізодефіцитних анеміях, посиленні пероксидації на стадії декомпенсації, а також з віком.

Лейцинамінопептидаза (ЛАП)- фермент, який каталізує відщеплення амідних груп від амінокислот (від лейцину, норлейцину, норваліну). Найбільший вміст – в тонкому кишечнику, нирках, печінці. Нормальна активність ЛАП в сироватці складає 33-100нМ/(с л). Підвищення активності – при механічній жовтяниці, метастазах в печінці, гепатитах різної етіології, цирозі печінки, холециститі, панкреатиті, а також в останні місяці вагітності та при прийомі пероральних контрацептивів. Визначення активності ЛАП має велике клінічне

значення; активність ЛАП ніколи не підвищується при захворюваннях кісткової системи, що може мати диференційно-діагностичне значення. При електрофоретичному розділенні сироватки крові в нормі виявляють одну зону активності – А. Другий компонент – В, з'являється в крові при вагітності, прийомі контрацептивів, механічній жовтяниці. При інших способах розділення виявляють до 6 форм ЛАП в сироватці крові, серед котрих виділяють ізоферменти підшлункової залози, печінкового, ниркового, кишкового походження.

Ліпаза (Лп)

Фермент, який каталізує гідроліз тригліцеридів з утворенням ді- та моногліцеридів. Найбільш важливою з клініко-теоретичної точки зору є Лп підшлункової залози. Нормальна активність Лп в сироватці крові складає 0-470нМ/(с·л) або 0-28мкМ/(хвил·л) або 0-160ОД/л. Багаторазове збільшення активності фермента в крові відмічається при гострому панкреатиті з максимумом в перші 12-24 години від початку нападу і нормалізацією після 10-12 днів. Підвищення активності Лп відмічається при карциномі підшлункової залози, інколи при хронічному панкреатиті та гострих і хронічних захворюваннях нирок, а також при спазмі сфінктера Одді будь-якого генезу, інфаркті кишки, перитоніті, введенні гепарину. При паротиті Лп не змінюється, якщо в патологічний процес не залучена підшлункова залоза. Зниження активності Лп викликають важкі метали, хинін. В нормі у сироватці крові виявляються одна анодна (Лп-1) і одна катодна (Лп-2) фракції. Остання в окремих випадках розщеплюється на низку підфракцій. Фракції мають органну специфічність (мозкова, селезінкова, ниркова, печінкова, лімфатичних вузлів), що принципово важливо у встановленні органної патології за ізоферментним спектром Лп.

ТЕМА 4. МЕТАБОЛІЧНІ, БІОСИНТЕТИЧНІ, ДЕЗІНТОКСИКАЦІЙНІ ТА ЕКСКРЕТОРНІ ФУНКЦІЇ ПЕЧІНКИ В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ

1. Вуглеводна (глікогенна) функція печінки
2. Функція печінки у регуляції ліпідного обміну.
3. Обмін білків та амінокислот у печінці.

Печінка займає центральне місце у метаболізмі, сприяє та підтримує протікання характерних для органів та тканин процесів, забезпечуючи тим самим регуляцію та інтеграцію міжорганного обміну речовин і є "центральною

біохімічною лабораторією організму" завдяки анатомічному розміщенню і багатому набору ферментів. Печінка виконує багатогранні функції:

1) Приймає і розподіляє майже всі речовини, що потрапляють в організм із шлунково-кишкового тракту. Вся кров, у яку всмоктались продукти перетравлення їжі та інші речовини з кишечника, поступає в печінку по ворітній вені. Речовини, що поступили з кров'ю, переходять у тканину печінки, піддаються певним перетворенням, деякі накопичуються і потім в незміненому вигляді або у вигляді метаболітів поступають у загальний кровообіг у випадку норми;

2) Служить місцем синтезу жовчних кислот і утворення жовчі, що забезпечує участь печінки у перетравленні ліпідів та їх транспорті. Приймає участь в виділенні деяких продуктів метаболізму із жовчу в кишечник;

3) Синтезує багаточисленні білки і ліпопротеїни плазми крові, низькомолекулярні біологічно активні речовини (креатин, 25-гідроксихолекальциферол, гем, холестерин та інші);

4) Синтезує кінцевий продукт азотистого обміну – сечовину (кінцевий продукт знешкодження аміаку);

5) Забезпечує знешкодження токсичних продуктів метаболізму, що утворюються в різних тканинах, а також продуктів гниття білків в кишечнику;

6) Приймає участь в метаболізмі чужорідних сполук (ксенобіотиків) і лікарських речовин;

7) Печінка – місце обміну та інактивації багатьох гормонів;

8) Депонує залізо та інші метали, вітаміни А, D, E, B₁₂, фолієву кислоту.

Отже, печінка виконує *метаболічні, біосинтетичні, дезінтоксикаційні та екскреторні функції*. Ушкодження клітин печінки, які можуть бути спричинені інфекційними хворобами, дією гепатотоксичних речовин, гіпоксією, тривалим закупоренням жовчних шляхів, зумовлюють розлади функцій печінки. Порушення цих функцій за умов печінково-клітинної недостатності, супроводжується важкими розладами у функціонуванні органів, тканин, зокрема центральної нервової системи (печінкова кома) і є станом, несумісним з життям.

Вуглеводна (глікогенна) функція печінки

Печінка відіграє важливу роль в підтриманні фізіологічної концентрації глюкози в крові та постачання її в інші органи (насамперед, в головний мозок) у періоди між прийомами їжі. Ініціюючим етапом включення глюкози в метаболічні перетворення є її фосфорилування до глюкозо-6-фосфату (Гл-6-Ф).

У печінці є два ферменти, які каталізують цю реакцію – неспецифічна гексокіназа і специфічна глюкокіназа (тільки в печінці), що відрізняються своїми каталітичними властивостями. При фізіологічних концентраціях

глюкози (3,3–5,5 ммоль/л) каталітично активною є *гексокіназа*, а ферментативна дія *глюкокінази* включається лише за умов значного збільшення надходження в гепатоцити глюкози після споживання багатої вуглеводами їжі, що забезпечує швидке фосфорилування глюкози і затримку її в печінці та попереджує значне підвищення вмісту глюкози в крові на висоті травлення (фосфорильована глюкоза не виходить із клітин у кров).

Глюкозо-6-фосфат – ключовий проміжний продукт обміну вуглеводів – може перетворюватись у печінці різними шляхами:

- 1) на синтез глікогену;
 - 2) по шляху гліколізу з утворенням пірувату і лактату;
 - 3) по пентозо-фосфатному шляху;
- розщеплятися під дією фосфатази на глюкозу і Фн

Функція печінки у регуляції ліпідного обміну

У печінці активно відбуваються більшість ферментативних реакцій синтезу та розщеплення різних класів ліпідів – жирних кислот, тригліцеридів, холестерину, фосфоліпідів (гліцерол- та сфінголіпідів), гліколіпідів.

Крім використання ліпідів для власних енергетичних та структурних потреб, печінці належить основна роль у регуляції окислення жирів іншими тканинами – функція, що реалізується шляхом утворення в гепатоцитах і секреції в кров тригліцеридів (у формі ліпопротеїдів дуже низької щільності – ЛПДНЩ) та кетонових тіл. У печінці утворюється також основна частина холестерину, що використовується в периферичних тканинах для синтезу фізіологічно активних стероїдів.

Синтез та секреція тригліцеридів.

В організмі людини і тварини основним місцем депонування високоенергетичних тригліцеридів є жирова тканина, а в печінці їх вміст менший 1% маси органа.

Під час значного фізичного навантаження, стресу, а також голодування в жировій тканині стимулюється ліполіз і вивільнення жирних кислот, які потрапляють у кров і у вигляді комплексу з альбумінами переносяться до органів і тканин. До 50% цих жирних кислот можуть поглинатися печінкою і використовуватися для окислення до CO_2 і H_2O , утворення кетонових тіл або синтезу тригліцеридів, фосфоліпідів і ефірів холестерину.

В умовах спокою і достатнього надходження поживних речовин з їжею, печінка отримує енергію в основному за рахунок окислення амінокислот, а не жирних кислот, а при голодуванні основним джерелом енергії стають жирні кислоти.

Важливим біосинтетичним шляхом у печінці є утворення жирних кислот і жирів (ліпогенез). Жирні кислоти синтезуються із ацетил-КоА, джерелом якого може бути глюкоза і амінокислоти, не використані для інших функцій. Механізм синтезу жирних кислот однаковий у печінці і жировій тканині.

При переході організму із змішаного раціону на раціон бідний ліпідами і багатий вуглеводами, у печінці індукується синтез ферментів, що беруть участь у біосинтезі жирних кислот (цитратліази, ацетил-КоА-карбоксилази, пальмітилсинтетази, ферментів пентозо-фосфатного циклу окислення глюкози). У печінці більш інтенсивно, ніж у інших органах відбуваються реакції подовження ланцюга жирних кислот і утворення мононенасичених жирних кислот. Отже, у печінці утворюється властивий даному виду набір жирних кислот.

Синтезовані жирні кислоти та жирні кислоти, що потрапили в печінку із хіломікронів під час травлення жирів їжі, а також жирні кислоти, звільнені із жирових депо при мобілізації жирів, використовуються в гепатоцитах для синтезу жирів, фосфоліпідів, ефірів холестерину або окислюються.

У печінці може зберігатися тільки обмежена кількість жирів, а надлишок їх виводиться в кров у складі ЛПДНЩ, що утворюються в гепатоцитах, секретуються в кров та утилізуються адипоцитами за рахунок наявності в ендотелії капілярів жирової тканини активної ліпопротеїнліпази. Біосинтез та секреція в кров гепатоцитами ЛПДНЩ зростає при збільшеному потоку жирних кислот, спрямованого з кишечника в печінку на висоті процесу травлення нейтральних жирів, а також в умовах дієти з високим вмістом вуглеводів, коли зростає ендогенний синтез у клітинах печінки довголанцюгових жирних кислот. Порушення синтезу ЛПДНЩ у гепатоцитах за умов токсичного або вірусного ураження печінки призводить до аномального накопичення в органі тригліцеридів – так званого "жирового переродження печінки". Це може бути зумовлено зниженням синтезу фосфоліпідів внаслідок нестачі холіну, тому холін і речовини, які сприяють його синтезу в печінці (зокрема амінокислота метіонін) проявляють ліпотропну дію.

Синтез та біотрансформація холестерину.

Печінка є основним місцем біосинтезу холестерину із ацетил-КоА (в середньому 250-500 мг на добу). Використання холестерину включає в себе внутрішньопечінковий синтез жовчних кислот та позапечінкові реакції утворення біологічно активних стероїдів: а) вітаміну D₃ та його похідних; б) кортикостероїдів кори наднирників; в) чоловічих та жіночих статевих гормонів.

Обмін білків та амінокислот у печінці

Роль печінки в білковому обміні полягає в утворенні більшості білків плазми крові, які виконують важливі біохімічні і фізіологічні функції, регуляції розподілу амінокислот між окремими органами і тканинами, синтезі сечовини як кінцевого продукту азотистого обміну.

Амінокислоти, що всмоктуються у кишечнику, потрапляють з кров'ю ворітної вени у печінку і використовуються тут в різних шляхах обміну:

- 1) синтез білків;
- 2) розпад до кінцевих продуктів;
- 3) перетворення у вуглеводи та ліпіди;
- 4) взаємоперетворення амінокислот;
- 5) перетворення у низькомолекулярні азотовмісні речовини;
- 6) звільнення в кров та доставка до інших органів та тканин для синтезу там білків і низькомолекулярних азотовмісних речовин.

Білоксинтетична функція печінки

Для печінки характерна висока швидкість синтезу і розпаду білків, як тих, що функціонують у самій печінці, так і тих, що секретуються в кров. Оскільки в організмі немає резерву білків і амінокислот, то при білковій недостатності, деякі менш функціонально важливі білки печінки, як і інших органів, розпадаються, а з амінокислот синтезуються життєво необхідні ферменти, білки-рецептори та інші білки.

В гепатоцитах синтезуються всі альбуміни плазми крові (13-18 г/добу), які беруть участь в підтриманні онкотичного тиску плазми крові, виконують транспортні функції. Гіпоальбумінемія є інформативною клініко-діагностичною ознакою гострої та хронічної недостатності печінки.

В печінці синтезується більша частина (80%) глобулінів плазми: 90% α 1-глобулінів, 75% α 2-глобулінів, 50% β -глобулінів, частина γ -глобулінів (ретикуло-ендотеліальні клітини). Захворювання печінки, при яких наявні важкі порушення структури та функцій органа, супроводжуються зниженням концентрації в крові α 1, α 2 і β -глобулінів, з іншого боку, патологічні процеси, які перебігають з активацією імунокомпетентних клітин печінки, призводять до збільшення рівня γ -глобулінів.

В клітинах печінки синтезується багато білкових факторів, що входять до складу згортальної, антизгортальної та фібринолітичної систем крові: V, X, XII, XIII фактори згортання, компоненти протромбінового комплексу (II, VII, IX, X фактори) фібриноген, антитромбін, антиплазмін, гепарин.

В печінці синтезуються ліпопротеїни плазми крові, фермент холінестераза та інші.

Порушення білоксинтезуючої функції гепатоцитів (зокрема при дії хімічних та біологічних пошкоджуючих факторів на рибосомальну систему трансляції)

супроводжується значним збільшенням концентрації вільних амінокислот в крові – гіпераміноацидемія, що супроводжується вираженою аміноацидурією.

Обмін амінокислот у печінці

Завдяки активному перебігу реакцій обміну амінокислот (трансамінування, дезамінування, декарбоксилювання), печінка приймає участь у підтриманні відносної біохімічної сталості амінокислотного складу крові. Після споживання білкової їжі окислювальний розпад амінокислот служить основним джерелом енергії в печінці. При голодуванні чи недостатньому надходженні вуглеводів з їжею за рахунок глюконеогенезу із амінокислот підтримується нормальна концентрація глюкози в крові (забезпечення глюкозою як основного джерела енергії мозку, еритроцитів, мозкової речовини наднирників).

У печінці здійснюється синтез замінних амінокислот при недостатньому їх надходженні з їжею. Отже, печінка може забезпечувати інші органи збалансованою сумішшю амінокислот, яка є необхідною для синтезу білків.

Деяка кількість амінокислот перетворюється в печінці в низькомолекулярні азотовмісні речовини – пуринові та піримідинові азотисті основи, гем, креатин, нікотинову кислоту, холін, карнітин, поліаміни. Розпад пуринових і піримідинових нуклеотидів до кінцевих продуктів (сечова кислота, аміак → сечовина) також відбувається в печінці.

Сечовиноутворююча функція печінки

Печінка є єдиним органом, що містить повний набір ферментів утворення нетоксичної сечовини з токсичного аміаку (продукт дезамінування амінокислот, пуринів, піримідинів, амінів). Порушення функціонування циклу сечовиноутворення, що можуть бути спричинені екзогенними пошкоджуючими факторами або спадковими ензимопатіями (генетичними дефектами синтезу ферментів біосинтезу сечовини), призводить до накопичення в крові та тканинах вільного аміаку – гіперамоніємія, гіпераміноацидемія, аміноацидурія. Найчутливішими до такого стану є нейрони головного мозку, в яких надлишковий аміак здатний до пригнічення функціонування Циклу Кребса за рахунок взаємодії NH_3 з α -кетоглутаровою кислотою у реакції відновлювального амінування. Гальмування реакцій Циклу Кребса, а в результаті цього зниження рівня АТФ у нервовій тканині, спричиняють деполяризацію мембран нейронів, порушення синаптичної передачі, що клінічно проявляється розвитком печінкової енцефалопатії та коматозного стану.

ТЕМА 5. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПОРУШЕНЬ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ ЗА СИСТЕМНИХ ХВОРОБ ТВАРИН

1. Вплив фізіологічного стану тварин на біохімічні показники крові.
2. Метаболічний профіль показників крові за різного фізіологічного стану тварин.

Основними об'єктами клініко-біохімічних досліджень є біологічні рідини організму: кров, плазма, сироватка, лімфа, рідше – інші рідини внутрішніх середовищ організму (спинномозкова рідина, внутрішньосуглобна рідина та ін.); використовуються також екскрети, такі як сеча, жовч, слина, шлунковий та кишковий сік, кал, піт, молоко; шматочки тканин та органів (біоптати), взяті прижиттєво під час хірургічних операцій або за допомогою спеціальних пристосувань.

Найчастіше матеріалом для клініко-лабораторних досліджень є кров і сеча, інші біологічні рідини.

Для правильного тлумачення результатів біохімічних досліджень слід враховувати такі принципи:

1. При дослідженні біохімічних показників у біологічних рідинах необхідно зважати на те, що кожний показник, який окремо визначається, відображає діяльність багатьох органів і тканин, а також функцію, що притаманна відповідній рідині, – транспортну, метаболічну, гомеостатичну (кров, сеча), екскреторну (сеча, жовч) тощо.

2. Усі процеси життєдіяльності можуть змінюватися під впливом зовнішніх чинників (корму, зміни часу доби, пори року або сонячної активності). Деякі параметри характеризуються значним діапазоном коливань, що необхідно враховувати при трактуванні результатів і порівнянні даних, отриманих у різні періоди відповідного ритму. Ці чинники набувають певного значення останнім часом завдяки розвиткові нового напрямку в лікуванні захворювань – хронотерапії.

3. Біохімічний склад біорідин та його зміни під впливом чинників довкілля зазнають індивідуальних коливань у різних тварин, відображаючи вплив генетичних особливостей, статі, віку, типу нервової діяльності, характеру годівлі, умов утримання тощо.

Ці фактори необхідно обов'язково враховувати при трактуванні результатів біохімічних досліджень для запобігання помилковим діагностичним рішенням.

4. При вирішенні питання про відхилення біохімічного параметру від норми, коли виконується індивідуальне обстеження тварини, правильніше орієнтуватися не на середні показники, одержані шляхом обстеження певної кількості умовно здорових особин, а на референтні (довідкові) показники, отримані з урахуванням вищезгаданих факторів. При проведенні наукових досліджень, визначені впливу лікувальних заходів, фармакологічних препаратів та ін., доцільно створювати контрольну групу із умовно здорових тварин і спиратися на показники, одержані при їх обстеженні та оброблені за допомогою методів статистичного аналізу. Але при цьому слід пам'ятати, що значення цих показників не повинні виходити за межі референтної норми.

5. Для отримання результатів біохімічного аналізу, які б достовірно відображали зміни в організмі, необхідно забезпечувати суворе дотримання правил забору проб біоматеріалу, належні умови його зберігання і транспортування до лабораторії. Виконання цих правил повністю залежить від клінічного персоналу і має перебувати під постійним контролем лікаря.

6. Трактуючи результати біохімічних досліджень, необхідно враховувати: умови, в яких перебуває тварина перед взяттям проби біоматеріалу, зокрема ступінь фізичної активності, положення тіла (стоячи, лежачи); інші діагностичні дослідження (введення контрастних матеріалів; проведення навантажуючих проб, деякі види пальпації, накладання джгута і т. п.); лікувальні заходи (лікарське, фізіотерапевтичне, хірургічне лікування).

Діагностичне значення результату біохімічного дослідження залежить від ступеня зв'язку досліджуваного параметра з патологічним процесом. Оскільки більшість біохімічних параметрів відображає вплив не одного, а декількох чинників, більшу частину змінених показників при біохімічних дослідженнях треба розглядати з позицій імовірного, багатофакторного підходу, а діагностичну цінність цих відхилень від норми для кожного виду патології розраховувати на підставі математичного аналізу значної кількості підтверджених випадків захворювання. При цьому слід враховувати величини діагностичної чутливості, специфічності, ефективності лабораторних тестів.

7. Результати біохімічних досліджень є лише часткою відомостей про стан тварини, яка обстежується. Зважаючи на високу варіабельність фізіологічних і патологічних процесів, у клінічній діагностиці здебільшого не можна спиратися тільки на дані біохімічного дослідження. Проте тісний зв'язок біохімічних параметрів з найбільш важливими процесами метаболізму дозволяє в ряді випадків виявляти біохімічними методами ранні та приховані форми патології, що може істотно розширити можливості ранньої діагностики діабету, порушень обміну ліпідів, подагри, гіперпаратиреоїдизму і особливо спадкової патології.

Слід пам'ятати: не можна ставити діагноз лише на підставі даних лабораторних досліджень. Необхідно враховувати дані анамнезу та результати попереднього обстеження хворої тварини, тобто дотримуватися клініко-біохімічних паралелей.

Важливе значення в одержанні правильних результатів має здійснення діагностичною лабораторією контролю якості процесу їх отримання. Він має три етапи:

- 1) доаналітичний;
- 2) аналітичний;
- 3) постаналітичний.

Доаналітичний етап включає правильний забір матеріалу, транспортування, реєстрування, зберігання і т. ін.

Різноманітність біохімічних досліджень вимагає раціональної тактики їх проведення і виконання *другого, аналітичного етапу* контролю якості процесу отримання результатів, до якого входять контроль відтворюваності та контроль правильності. Вони виконуються з використанням спеціальних контрольних сироваток.

Контроль відтворюваності дозволяє оцінити точність виконання, а контроль правильності – уникати систематичних помилок і контролювати правильність одержаних результатів.

Третій, постаналітичний етап контролю якості передбачає дотримання правил реєстрування даних досліджень у спеціальному журналі, оформлення аналізів, наведення в ньому показників референтної норми тощо.

Метаболічний профіль показників крові за різного фізіологічного стану тварин

На сучасному рівні ветеринарної медицини уявлення про клінічні, фізіологічні і патологічні показники при захворюваннях недостатні. Необхідні результати біохімічних досліджень, що може допомогти в розробці тестів ранньої діагностики і перевірки ефективності терапії.

Дослідження вмісту біохімічних компонентів у крові, інших біологічних рідинах, тканинах здорових тварин і їх змін при захворюваннях, дозволяє за допомогою лабораторних досліджень проводити своєчасну діагностику (при відсутності клінічного прояву) хвороби та контролювати повноцінність раціону. При зміні біохімічних показників на ранніх стадіях порушень, їх вдається повернути до норми за допомогою збалансованої годівлі.

Фактори, що впливають на показники крові

Продуктивність. У високопродуктивних корів в сироватці крові рівень загального протеїну і залишкового азоту вище, ніж у менш продуктивних. Так, у корів з середньорічним надоєм 8000 кг рівень білка в середньому складає 8,27 г%, тоді як у корів з надоєм 4000 кг – 7,58 г%; у високопродуктивних корів рівень залишкового азоту в сироватці крові у перший період лактації досягає в середньому 54,04 мг%, у середньопродуктивних 43,48 мг%. Причиною цього є активація обміну протеїнів у високопродуктивних тварин. В крові високопродуктивних курей міститься більше фосфоліпідів і холестеролу, зв'язаного з глобулінами, вище активність лужної фосфатази.

Фізіологічний стан тварини. У корів у процесі лактації змінюється в сироватці крові вміст альбумінів і глобулінів. Максимальний рівень глобулінів спостерігається у перший період лактації. З глобулінових фракцій найбільш виражена залежність між величиною надоїв і динамікою фракції альфа-глобулінів.

Біохімія і патобіохімія гемоглобіну

Гемоглобін складається з 4 субодиноць, зв'язаних з гемом через залишок гістидину. Субодиноці є двох типів: 2 λ і 2 β – ланцюги, що містять по 141 і по 146 амінокислотних залишків. При високому парціальному тиску O_2 (100 мм рт. ст.) гемоглобін приєднує його у капілярах альвеол і віддає у венозних капілярах, де парціальний тиск O_2 нижчий і дорівнює 25-40 мм рт. ст.

Ступінь оксигенації гемоглобіну залежить від:

- p_{O_2} (парціальний тиск кисню);
- pH (показник кислотності середовища);
- концентрації CO_2 ;
- концентрації 2,3 – дифосфогліцерату (ключовий макроергічний субстрат гліколізу).

Використання кисню мітохондріями створює „кисневий вакуум”, який сприяє всмоктуванню кисню клітинами. При високій концентрації вуглекислого газу гемоглобін зменшує здатність гему до оксигенації за рахунок зниження pH – ефект Бора. Такий же ефект спостерігається при концентрації 2,3 – дифосфогліцерату – головного метаболіту гліколізу.

Перенесення CO_2 від тканин до легень також забезпечує гемоглобін. Це відбувається внаслідок зв'язування його з N-кінцевою λ -аміногрупою кожного із ланцюгів з утворенням карбгемоглобіну. Також, маючи кислі властивості, гемоглобін взаємодіє із гідрокарбонатами, чим сприяє вивільненню вугільної кислоти, яка є нестійкою і в альвеолах легко відщеплює від себе CO_2 , який ми видихаємо. Патологічні форми гемоглобіну пов'язані з мутаціями у генах, які

контролюють синтез λ - і β -ланцюгів. Відомі різні форми ізобілків гемоглобіну зі зміненим порядком амінокислот у ланцюгах. Це порушує їх здатність зв'язувати кисень. Тобто виникають патологічні форми гемоглобіну – гемоглобінози, які поділяють на гемоглобінопатії і таласемії. У першому випадку наявне порушення первинної структури білка, тобто субодиноць; у другому випадку – у мутантних формах відсутні λ - або β -ланцюги. Перерахуємо відомі патологічні форми гемоглобіну. Hb F (фетальний) – властивий плоду і зникає у 3-х місячному віці. Він подібний до міоглобіну, не здатний до швидкої окси- і деоксигенації. У дорослої людини з таким дефектом його вміст підвищений у 10 – 20 разів і людина страждає від гіпоксії у зв'язку з неможливістю виконувати функцію транспортування газів. HbS – мутантна форма гемоглобіну, в якого у β -ланцюгу в 6-тій позиції замість залишку глютамінової кислоти присутній залишок валіну. Ця заміна зменшує негативний заряд молекули гемоглобіну і супроводжується зниженням його спорідненості до кисню та здатністю окремих молекул гемоглобіну злипатися з утворенням намистоподібних агрегатів. Еритроцити набувають форми серпа, що відображається на назві захворювання – серпоподібноклітинна анемія. HbC – аномальний гемоглобін, у молекулі якого існує заміна глютамінової амінокислоти в 6-му положенні β -ланцюга на лізин. Еритроцити, що містять такий аномальний гемоглобін, здатні до гемолізу, що також супроводжується розвитком анемії. HbM – у такій групі гемоглобінів M відсутній гістидин, що зв'язує гем із залізом. Це спричиняє накопичення метгемоглобіну (містить Fe 3+ у гемі), який нездатний транспортувати O₂. HbA_{1c} – глікозильований гемоглобін. Він з'являється в еритроцитах за умов некомпенсованого цукрового діабету. Таласемії – гемолітичні анемії, що розвиваються внаслідок утворення аномальних форм гемоглобінів, у глобіні яких відсутній λ -ланцюг або β -ланцюг. Буферні системи крові Кров відіграє значну роль у підтриманні кислотно-лужного гомеостазу. Реакція крові здорової людини слаболужна: $\text{pH} = 7,36$. Регуляція кислотнолужного балансу здійснюється буферними системами крові

До буферних систем крові належать: бікарбонатна, фосфатна, система білків плазми крові, гемоглобін – оксигемоглобін – система. Найбільше значення для підтримання кислотно-лужного балансу крові й організму загалом мають бікарбонатна буферна система та система гемоглобіну. Існує стале співвідношення $3 \text{ } \text{NaHCO}_3 : 2 \text{ } \text{CO}_2 = 18 : 1 - 20 : 1$. Тобто, вміст бікарбонатів перевищує вміст вугільної кислоти у 18-20 разів. Це забезпечує деяку лужність крові. Запас бікарбонатів отримав назву лужного резерву крові, який протидіє зсуву pH у кислий бік. Гемоглобінова буферна система утворена оксигемоглобіном (сильна кислота) і дезоксигемоглобіном (слабка кислота). Буферна дія цієї системи полягає у зв'язуванні O₂ і CO₂. Порушення кислотно-

лужного балансу – патологічні стани, що характеризуються надмірним накопиченням в організмі кислих сполук (ацидоз) або лужних сполук (алкалоз). Вони існують у двох варіантах: метаболічному і респіраторному типі. Метаболічний ацидоз характеризується зменшенням концентрації HCO_3^- - внаслідок накопичення кислот чи втрати лугів організмом. Метаболічний алкалоз спостерігають навпаки при підвищенні концентрації HCO_3^- - внаслідок втрати кислот або накопичення лугів. Респіраторний ацидоз є наслідком збільшення концентрації вугільної кислоти у зв'язку з порушенням виділення вуглекислого газу легень. Респіраторний алкалоз настає внаслідок зниження вмісту в крові вугільної кислоти у результаті легеневої гіпервентиляції та підвищеного виділення вуглекислого газу. Біохімічний склад крові в нормі та при патологіях Хімічні компоненти, що входять до плазми крові поділяють на: білки, небілкові органічні компоненти та неорганічні компоненти.

За своїми властивостями розрізняють білки: транспортні, ферменти, гормони, антитіла, антитоксини, фактори коагуляції та антикоагуляції. Загальна концентрація їх 65-85 г/л. Зниження настає в похилому віці, при голодуванні, виснажливих інфекційних хворобах, після травм, злоякісних утворень. Основні фракції білків: – альбуміни – транспортування (трансферин – Fe^{3+}); – глобуліни – λ -транспортування ліпідів, β -антитоксини, γ -імунні реакції (антитіла); – фібриноген – зсідання крові; – протромбін. Ферменти плазми крові: лактатдегідрогеназа, аспартатамінотрансфераза, аланінамінотрансфераза, фосфатази: лужна і кисла, λ -амілаза, креатинкіназа, холінестераза, глутаматдегідрогеназа, γ -глутамілтрансфераза. Безазотисті: вуглеводи – 70-120 мг%; ліпіди – 5-7 г/л. Неорганічні: Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Cu^{2+} , аніони HCO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} .

Калікреїн-кінінова система забезпечує судинний тонус, мікроциркуляцію, запалення, алергії. Небілкові компоненти: сечовина, амінокислоти, креатинін. Біохімія згортання крові Згортання крові (коагуляція) – це фізіолого-біохімічний процес, внаслідок якого кров втрачає текучість і утворює тромби. Це забезпечує система гемостазу. Вона складається з ферментів, біохімічних чинників, тромбоцитів та інтимів кровоносних судин. Процес згортання є каскадом послідовних ферментативних реакцій, які каталізують білки – фактори згортання FI – FXIII. За Міжнародною номенклатурою: фактор I – білок плазми крові фібриноген; фактор II – білок тромбоцитів протромбін; фактор III – тканинний білок тромбопластин; фактор IV – іоникальцію; фактор V – проакцелерин; фактор UP – проконвертин; фактор UIII – антигемофільний глобулін A, фактор Вілленбранда; фактор IX – антигемофільний глобулін B, фактор Криспшаса; фактор X – фактор Стюарта-Провера; фактор XI – плазмовий попередник

тромбопластину, фактор Розенталя; фактор XII – фактор Хагемана; фактор XIII – фібриностабілізуєчий фактор. У згортанні крові, крім перерахованих факторів, беруть участь також тромбоцитарні фактори коагуляції, які позначають латинською літерою P із цифровими індексами: P1-P11.

Механізм згортання крові ґрунтується на принципі ферментної активації одних факторів іншими. Таким чином виникає каскад реакцій, у якому ефект фактора, що запускає першу реакцію, багаторазово посилюється на наступних стадіях. Усього декілька молекул одного фактора FXII необхідно для активації сотень молекул іншого FXI, який активує тисячі молекул наступного FIX. Це веде, в кінці кінців до утворення великої кількості фібрину. Молекули фібрину за допомогою водневих зв'язків об'єднуються в агрегат – м'який згусток, який за допомогою утворення міцних ковалентних зв'язків між залишками глютаміну і лізину сусідніх молекул фібрину перетворюється в міцну тримірну сітку, в яку входять тромбоцити, еритроцити і лейкоцити (тромб). У цих процесах особливу роль відіграє вітамін K, який входить до складу фермента, що забезпечує формування факторів II, VII, IX, X. Дефектні молекули цих факторів не містять γ -карбоксиглутамінової кислоти і перетворюються в активні форми повільно. Нестача вітаміну K у кишківнику, а також наявність антагоніста цього вітаміну – дикумаролу, – сповільнюють процес згортання крові і спричиняються до кровотеч. Існує внутрішній та зовнішній шляхи коагуляції. Внутрішній шлях реалізує коагуляційний процес за участю факторів крові, а зовнішній – крім факторів плазми включає в процес також тканинні фактори. Центральна подія, яка об'єднує ці два шляхи коагуляції полягає в утворенні FX-фактора Стюарта-Провера. Це Ca^{2+} – залежний глікопротеїд, що синтезується в печінці при участі вітаміну K. Спадкові порушення згортання крові мають назву – коагулопатії. Найпоширеніші з них – гемофілія, яка буває трьох типів: перший вид спостерігають за умови нестачі фактора; другий вид носить назву афібриногенемія (відсутність фібрину), а третій – дисфібриногенемія, пов'язана з наявністю видозміненого фібрину. Антизгортальна система. До основних антикоагулянтів відносяться: антитромбін III, гепарин. Вони виконують функцію інгібіторів певних білкових факторів згортання крові. За умов зниженого їх вмісту кров набуває схильності до посиленого згортання і тромбозу. Отже, наявність у плазмі антикоагулянтів є необхідна для збереження рідкого стану крові. Порушення в системі згортання крові і антикоагуляційній системі проявляються у вигляді або тромбозів, або геморагій. Серед антикоагулянтів природного (рослинного) походження відомими є кумарини – антагоністи вітаміну K. Їх застосовують для профілактики та лікування тромбозів. Фібриноліз. У процесі фібринолізу тромб розсмоктується, розщеплення фібрину відбувається під впливом ферменту плазміну. При

згортанні крові плазміноген адсорбується фібрином і фіксується на тромбі, де поступово активується і перетворюється на плазмін, який гідролізує фібрин. Перетворення плазміногену в плазмін відбувається також і при дії стрептокінази (стрептококова інфекція). Продукти деградації фібрину виводяться з сечею і можуть слугувати біохімічними маркерами внутрісудинної коагуляції.

ТЕМА 6. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ В НЕФРОЦИТАХ ПРИ НЕФРОПАТІЯХ І ФУНКЦІОНАЛЬНИХ РОЗЛАДАХ ОРГАНІВ СЕЧОВИДІЛЕННЯ

Нирки виконують такі функції:

- екскреторну;
- регулюють водно-сольовий баланс;
- регулюють кислотно-основну рівновагу;
- регулюють осмотичний тиск рідин організму;
- регулюють артеріальний тиск організму;
- стимулюють еритроцитопоез.

Процес утворення сечі починається у клубочках внаслідок фільтрації плазми через стінки капілярів судинного пучка до капсули. Рушійною силою фільтрації є гідростатичний тиск крові в капілярах клубочка, який у середньому становить 70–80 мм рт.ст. (тут тиск значно більший, ніж у капілярах інших органів). Гідростатичному тиску в капілярах (P_k) клубочків протидіють онкотичний тиск білків плазми (P_b) крові і тиск усередині капсули Шумлянського–Боумена ($P_{капс}$), які відповідно становлять 25–30 і 10–20 мм рт. ст. Отже, для забезпечення фільтрації сечі необхідно, щоб гідростатичний тиск у капілярах був більшим за суму онкотичного і внутрішньокапсулярного тиску ($P_k > P_b + P_{капс}$). У нормі ця величина, яка зветься ефективним тиском фільтрації (ЕТФ), становить близько 30 мм рт. ст.:

$$ЕТФ = P_k - (P_b + P_{капс}) = 30 \text{ мм рт. ст.}$$

Унікальність судинної системи нирок полягає в тому, що капіляри судинного пучка нефрону не переходять безпосередньо у вени, а дають початок еферентним артеріям нефрону (рис. 34). Це має велике значення для підтримання сталості внутрішньониркового протікання крові, а отже – і для стабільності процесу фільтрації. Зміни тиску крові в межах 90–190 мм рт. ст. не впливають на величину клубочкової фільтрації.

Другим фактором, що впливає на величину фільтрації первинної сечі, є величина фільтраційної поверхні ниркових клубочків, яка у свою чергу залежить від кількості функціонуючих клубочків та їхньої проникності. Фільтраційну здатність нирок визначають за величиною клубочкової фільтрації. Вона дорівнює кліренсу таких речовин, для яких фільтруюча мембрана клубочків є абсолютно проникною і які після фільтрації не реабсорбуються і в той же час не секретуються клітинами каналцевого епітелію. Такими речовинами є інулін, який вводиться внутрішньовенно, та ендogenous креатинін.

Протягом доби у нирках людини приблизно з 1500 л крові, що протікає, утворюється 180–200 л первинної сечі. Це відповідає утворенню за 1 хв 125 мл ультрафільтрату $[180 \text{ л} : (24 \text{ год} \times 60 \text{ хв})] = 0,125 \text{ л/хв}$. У здорових людей величина клубочкової фільтрації становить $125 \pm 30 \text{ мл}$. У корів щодоби виділяється 10–12 л сечі, тобто первинної сечі утворюється 1000–1200 л. Тоді величина клубочкової фільтрації становить: $1000 : (24 \times 60) \approx 0,7 \text{ л/хв}$, або $[1200 \text{ л} : (24 \times 60 \text{ хв})] = 0,83 \text{ л/хв}$.

Зниження клубочкової фільтрації може бути зумовлене позанирковою і нирковою патологією. Позаниркові причини – це, насамперед, хвороби серцево-судинної системи з недостатністю кровообігу.

Профільтрована первинна сеча є ізотонічною. В міру переміщення рідини по низхідній частині каналців осмотичність її збільшується від 300 до 1200 мОсм/кг H₂O у мозковій речовині нирок внаслідок реабсорбції води

Активний транспорт натрію хлориду з висхідної частини петлі до навколишнього середовища підтримує гіперосмотичність інтерстицію. Внаслідок інтенсивного виведення натрію хлориду з просвіту висхідної петлі зростає його концентрація в інтерстиції і водночас зменшується у просвіті каналців. Ця ж частина каналців є непроникною для води, тому осмотичність рідини в петлі зменшується до 100 мОсм/кг H₂O.

Ситуація змінюється у звивистій частині дистального каналця та в кірковій частині збірного каналця під дією вазопресину (АДГ), оскільки стінки цих каналців є добре проникними для води. Вода вільно переходить за межі каналців до інтерстицію, поки не відбудеться вирівнювання осмотичного тиску. У результаті каналцева рідина стає знову ізоосмотичною. У міру переміщення рідини в напрямку до верхівки піраміди ситуація повторюється: гіпертонічне середовище інтерстицію знову всмоктує воду із каналців, що зумовлює утворення концентрованої сечі. За низької концентрації вазопресину звивистий дистальний та збірний каналці є непроникними для води, але іони натрію активно реабсорбуються внаслідок дії альдостерону, тому сеча, яка виділяється нирками, є гіпоосмотичною – її осмотичність може становити 40 мОсм/кг води

Порушення концентрування сечі може мати ниркове або позаниркове походження. В останньому випадку частіше спостерігається порушення концентрування сечі гіпоталамо-гіпофізарного походження. Абсолютна або відносна недостатність секреції вазопресину (АДГ) спричинює поліурію за такого стану: а) пухлини гіпофіза; б) менінгіт, туберкульоз; в) травми. У той же час за нормальної секреції вазопресину може розвиватися ареактивність або гіпореактивність нирок до дії вазопресину внаслідок ураження їх (інтерстиціальний нефрит, полікістоз нирок) та природженої ниркової патології.

Кінцева концентрація сечі утворюється в з'єднуючих каналцях, клітини яких мають рецептори до вазопресину, альдостерону та натрійуретичного фактора передсердя. Вазопресин і альдостерон затримують виділення іонів натрію та води, а натрійуретичний фактор має протилежну дію.

Отже, добовий діурез залежить як від величини клубочкової фільтрації, так і реабсорбційних процесів у ниркових каналцях. Він може збільшуватися (поліурія) і зменшуватися (олігурія) або ж сеча зовсім не виділяється (анурія та ішурія).

Зменшення діурезу (олігурія) спостерігається при недостатній фільтрації сечі у клубочках або підвищенні реабсорбції в каналцях. Вона виникає при гострому дифузному гломерулонефриті і зумовлена порушенням кровообігу в судинах ниркових клубочків внаслідок їх спазму, випотіванням трансудату в просвіт капсули Шумлянського-Боумана, який стискує клубочки, що ще більше порушує кровообіг у нирках, сприяє затримці води і хлоридів та розвитку набряків. При різко вираженому нефриті олігурія може перейти в анурію, яка протягом п'яти днів спричинює смерть.

При хронічному нефриті олігурія розвивається в результаті зменшення загальної кількості функціонуючих клубочків, потовщення й ущільнення петель клубочкових капілярів, гіалінізації їхніх базальних мембран, розростання сполучнотканинних елементів між петлями та навколо капсули.

Олігурія при ліпоїдному та амілоїдному нефрозі зумовлюється закупоренням каналців злушеним епітелієм і циліндрами, відкладанням амілоїду у стінках судин клубочків, між петлями та в капілярних петлях клубочків, стисненням клубочків амілоїдом, які зморщуються і заміщуються глибокими амілоїду. Окрім того, олігурія розвивається внаслідок екстраренального затримання виділення сечі збільшеною секрецією альдостерону, який підвищує реабсорбцію іонів натрію і води в каналцях. Олігурія розвивається також при серцево-судинній недостатності, значних позаниркових втратах води (гастроентерит, кровотеча, утворення масивних випотів при асциті та плевриті).

Ішурія – це часткове або повне припинення виділення сечі з переповненого сечового міхура, коли секреція нирок не порушена. Спостерігається при

стисненні і травмі уретри, закупоренні її сечовими каменями або піском, скороченні сфінктера сечового міхура.

Поліурія розвивається у стадію функціональної недостатності нирок при хронічному нефриті та нефросклерозі, коли нирки втрачають концентраційну функцію, при розсмоктуванні трансудатів і ексудатів. Найбільш виражена поліурія спостерігається при нецукровому діабеті, коли зменшується секреція антидіуретичного гормону (вазопресину), внаслідок чого порушується канальцева реабсорбція води. Вона є типовим симптомом цукрового діабету і компенсаторною реакцією організму у відповідь на збільшення осмотичного тиску. Чим більший уміст глюкози і ацетонових тіл у крові при діабеті, тим сильнішим є відчуття спраги. Випита вода разом із глюкозою виводиться нирками. Поліурія при цукровому діабеті в людей може досягати 7–10 л сечі за добу.

Зміни хімічного складу сечі

При різних захворюваннях може змінюватися концентрація речовин, які є природними компонентами сечі, або, залежно від патологічного стану, у сечі з'являються речовини, які в нормі не виділяються із сечею чи виділяються у невеликій кількості і не виявляються в ній. Концентрація деяких речовин упродовж доби в окремих порціях сечі може значно змінюватися, інших – залишатися незмінною. Тому для більш об'єктивної характеристики змін хімічного складу сечі слід визначати добовий об'єм сечі і загальну кількість речовин у ній.

Постійними компонентами сечі є азотовмісні (кінцеві продукти обміну білків і нуклеїнових кислот) і безазотисті (продукти метаболізму вуглеводів, ліпідів, частково білків і нуклеїнових кислот) речовини. Серед азотовмісних органічних речовин основну кількість складає сечовина. Крім того, у сечі містяться креатинін, сечова кислота, амінокислоти, індикан, алантоїн, пуринові та піримідинові основи, гіпурова кислота та ін.

При патології в сечі можуть виявлятися речовини, які в нормі вона не містить або які в ній практично не визначаються (наприклад, поява в сечі крові, цукру, кетонів у підвищеній концентрації тощо). Всі ці зміни зумовлюють значні відхилення у властивостях і складі сечі.

Патологічні стани нирок. Захворювання нирок – дуже поширена патологія, яка спостерігається в 7–10 % дорослих тварин. Ураження нирок може бути самостійним або виникає на фоні будь-якого іншого захворювання.

Необхідно зазначити, що при нефрологічних захворюваннях лабораторна діагностика має винятково важливе значення.

Найбільш поширені захворювання нирок та їх біохімічні констеляції
Гострий гломерулонефрит – гостре імунзапальне захворювання, при якому насамперед уражений клубочковий апарат обох нирок.

Біохімічні зміни схематично відображають так:

у сироватці – $\wedge$ креатинін, сечовина; холестерол (незначно),

v загальний протеїн;

у сечі – $\wedge$ протеїн.

Хронічний гломерулонефрит – запальне захворювання обох нирок, яке виникає внаслідок перенесеного гострого стрептококового нефриту та інших системних захворювань.

Біохімічні зміни:

у сироватці – без суттєвих змін, а в сечі з'являється протеїн.

Хронічний пієлонефрит – інфекційно-запальне захворювання, при якому в запальний процес включаються не тільки миски, а й сама ниркова тканина.

Протеїнурія. У нормальній сечі міститься мінімальна кількість білка, наявність якого не може бути виявлена звичайними якісними реакціями на білок. Фізіологічна протеїнурія спостерігається в новонароджених у перші чотири-шість діб. При ряді захворювань, особливо нирок, уміст білка в сечі значно збільшується (протеїнурія). Джерелом його є білки сироватки крові, а також певною мірою білки ниркової тканини. Іноді в сечі виявляють особливі білки, які відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями від білків здорового організму. Так, при злоякісних пухлинах кісткового мозку в сечі з'являється білок Бенс-Джонса, який має відносно низьку молекулярну масу, а також відрізняється тим, що при 50–60 °C у кислому середовищі він осаджується, а при вищих температурах знову розчиняється.

Протеїнурія є не лише важливим симптомом багатьох захворювань, а часто й важким ускладненням, оскільки призводить до втрати організмом великої кількості білків. Крім білків, із сечею можуть виділятися продукти розщеплення білкової молекули – різного розміру поліпептиди, а також амінокислоти. Це спостерігається при деяких інфекційних хворобах (туберкульозі) внаслідок значного розпаду тканинних білків.

Протеїнурія буває преренальною (переднирковою), ренальною (нирковою) і постренальною (позанирковою).

Передниркова (преренальна) протеїнурія зумовлена появою в плазмі крові підвищеної кількості білків, які фільтруються до каналців у кількості, що перевищує їх реабсорбційну ємність. До такої патології належать гемоглобінурія при гемолітичних синдромах та міоглобінурія внаслідок пошкоджень м'язів. Тривала преренальна протеїнурія спричинює пошкодження клубочків і розвиток нефротичного синдрому з масивною втратою білка.

Ниркова (ренальна) протеїнурія буває функціонального або органічного походження, а залежно від місця ураження – клубочкова і канальцева. Функціональна ниркова протеїнурія спостерігається у новонароджених тварин протягом перших 10-ти днів життя та в корів перед отеленням, характеризується короточасним перебігом і не супроводжується клінічними симптомами. Проте функціональна протеїнурія може розвиватися при серцевій недостатності, гарячці та гіпертонії. Органічна ниркова протеїнурія виникає внаслідок структурних змін у нирках і спричинена підвищенням проникності ниркових клубочків (клубочкова) або пошкодженням канальців (канальцева) протеїнурія.

Клубочкова протеїнурія зустрічається найчастіше і спричинюється багатьма хворобами різної етіології. Величина протеїнурії залежить від пошкодження клубочків: незначні пошкодження обмежуються виділенням білка з малою молекулярною масою (альбумін і трансферин). Прогресування хвороби призводить до зростання протеїнурії внаслідок підвищення проникності клубочків, через які починають проходити білки з більшою молекулярною масою. При гострому гломерулонефриті в сечі виявляють від 0,1 до 1,5 % білка.

Канальцева протеїнурія спричинюється порушенням реабсорбції білків у канальцях і характеризується зростаючим виділенням із сечею білків із малою молекулярною масою, які вільно проходять через стінку клубочків. Це –2-макроглобулін, лізоцим, 1-мікроглобулін та ряд інших білків. Протеїнурія при нефротичному синдромі становить 1–5 %. Канальцева протеїнурія здебільшого спостерігається одночасно з клубочковою.

Позаниркова протеїнурія розвивається при захворюваннях сечового міхура, уретри, уроцистолітіазі. Кількість білка в сечі при цьому не перевищує 1 г/л. Протеїнурія також зустрічається при захворюванні статевих органів: у самок – при запаленнях матки і піхви, у самців – при запаленні передміхурової залози (несправжня протеїнурія).

Гематурія – це поява в сечі значної кількості формених елементів крові. Гематурія буває нирковою та позанирковою. Ниркова гематурія є типовим симптомом гострого нефриту. Позаниркова гематурія спостерігається при запальних процесах або травмах сечових шляхів.

Гемоглобінурія пов'язана переважно з гемолізом еритроцитів.

Поява міоглобіну в сечі характерна для паралітичної міоглобінурії коней. Вона також спостерігається при механічних травмах м'язів, тяжкому міозиті. Гематурію діагностують, як правило, дослідженням осаду сечі під мікроскопом, а гемоглобінурію і міоглобінурію – хімічними методами.

Глюкозурія. Нормальна сеча тварин містить мінімальну кількість глюкози, яка не виявляється звичайними якісними пробами, а тому прийнято вважати, що сеча здорових тварин глюкози не містить. При надмірній кількості глюкози в

крові – гіперглікемії – нирки навіть за нормальної функції не в змозі забезпечити повну реабсорбцію глюкози з первинної сечі, і глюкоза виводиться з сечею, тобто розвивається глюкозурія. Рівень глюкози у крові, при якому починається глюкозурія, називається нирковим порогом. Для людей нирковий поріг становить 10 ммоль/л за максимальної норми глюкози в крові 5 ммоль/л, для жуйних – відповідно 5–6 і 3,5 ммоль/л, моногастричних тварин – 8–9 ммоль/л.

Глюкозурія буває фізіологічною і патологічною. Фізіологічна глюкозурія спостерігається при поїданні тваринами великої кількості вуглеводних кормів, після значного фізичного навантаження, у перед і післяродові періоди, при внутрішньовенному введенні глюкози і гіпертонічного розчину натрію хлориду. Короткочасна фізіологічна глюкозурія є наслідком збудження симпатичного відділу автономної нервової системи, що, очевидно, супроводжується посиленням розпадом глікогену в печінці.

Патологічна глюкозурія спостерігається при ураженні центральної нервової системи (неінсулярна), інсулярного апарату підшлункової залози (див. гіперглікемію) та інших залоз внутрішньої секреції (ендокринна глюкозурія), а також при ураженні нирок (ренальна).

Неінсулярна глюкозурія спостерігається при ураженні центральної нервової системи (сказ, чума собак, лістеріоз, менінгоенцефаліт, травми і пухлини мозку) та деяких отруєннях. Серед ендокринних глюкозурій слід виокремити глюкозурії, спричинені зменшенням синтезу інсуліну, гіперфункцією надниркових залоз (мозкової речовини і рідше – кори), гіпофіза, щитоподібної залози. До цієї ж групи належить печінкова глюкозурія, яка спричинюється порушенням глікогенсинтезувальної функції печінки.

Ренальна глюкозурія зумовлюється зниженням реабсорбції глюкози в ниркових каналцях (ренальний діабет) і може спостерігатися при хворобах нирок (гломерулонефрит, нефроз, нефросклероз). У таких випадках рівень глюкози в крові нормальний або навіть дещо знижений. Зниження реабсорбції глюкози у каналцях виникає внаслідок зменшення активності ферментів, які забезпечують цей процес (гексокіназа і глюкозо-6-фосфатаза).

Кетонурія – це виділення із сечею ацетону, ацетооцтової та β -оксимасляної кислот. Невелика кількість їх міститься в сечі здорових тварин (до 1,7 ммоль/л), оскільки вони не мають порогової концентрації. Кетонурія виникає внаслідок порушення обміну вуглеводів, ліпідів, білків і є типовою ознакою кетозу. Вона спостерігається також при цукровому діабеті та атоніях передшлунків.

Білірубінурія. У сечі здорових тварин жовчні пігменти (білірубін, білівердин) звичайними методами лабораторного дослідження не виявляються. Гіпербілірубінемія та білірубінурія спостерігаються при ураженні печінки і жовчних шляхів. Сеча і її піна при цьому набувають темного жовто-зеленого

відтінку. Із сечею виділяється лише прямий білірубін, а непрямий білірубін навіть при високій його концентрації в крові із сечею не виділяється, оскільки зв'язаний із білками сироватки. Тому поява його в сечі свідчить про значне ураження ниркової тканини. Виявлення жовчних пігментів може бути діагностичним тестом при диференціації паренхіматозної і механічної жовтяниці від гемолітичної, при якій у сечі зростає вміст стеркобіліну та уробіліну, а білірубін відсутній.

Уробілінурія. Уробілін у сечі міститься в незначній кількості, а при гемолітичній і паренхіматозній жовтухах уміст його різко збільшується. Це пов'язано із втратою здатності печінки затримувати і руйнувати уробіліноген, який всмоктується із кишечника. Відсутність у сечі уробіліногену при наявності білірубіну, навпаки, вказує на припинення надходження жовчі в кишечник унаслідок закупорення жовчного протоку (механічна жовтяниця).

Біохімічні механізми сечокам'яної хвороби

Сечокам'яна хвороба характеризується утворенням і відкладанням сечових каменів, які локалізуються у нирках, сечоводах, сечовому міхурі і сечовивідному каналі.

Хвороба відома здавна. Камені нирок були знайдені при дослідженні мумії Стародавнього Єгипту, поховання якої належить до 3500–4000 рр. до н.е. Хвороба була відома Гіппократу, який писав: “Лікар, побачивши пісок у сечовому міхурі, думає, що це сечовий міхур страждає, але це не міхур страждає, це страждає нирка”.

Частіше хворіють норки, вівці, коти, собаки. Уролітіаз кішок у структурі захворюваності становить 5–10 % від загальної кількості хворих. Особливо схильні до захворювання коти перської породи, зокрема кастрати другого-третього року життя.

Загальним у структурі сечових каменів є наявність так званого ядра, навколо якого розташована оболонка або тіло каменя. Більшість ниркових каменів (у людей 70–90 %) є кальцієвими солями фосфорної, щавлевої (оксалатні), рідко вугільної кислот. Частина ниркових каменів (10–15 %) представлені магнієвими та амонійними солями фосфорної кислоти – струвіт (у котів таких каменів найбільше), приблизно стільки ж припадає на частку натрієвих солей сечової кислоти (уратів). У норок, на відміну від тварин інших видів, частіше виявляються цистинові камені. Вони також часто зустрічаються у самців такс. Причиною цистинових каменів є патологія печінки, де проходять перетворення цистину або сповільнене зворотне всмоктування цистину у звивистих каналцях нирок (цистинурія). Оскільки цистин погано розчиняється у воді, тому він

осаджується в нирках і сечових шляхах, утворюючи цистинові камені. Розчинність цистину в кислій сечі менша, ніж у лужній. Цим, очевидно, можна пояснити велику кількість цистинових каменів у норок.

Камені, що складаються з кальцію оксалату, патогномонічні для оксалурії – спадкового порушення метаболізму гліцину, при якому весь синтезований гліцин окиснюється через гліоксилову кислоту до щавлевої. Кальцію оксалат випадає в осад за будь-якої реакції сечі.

Уратні камені складаються в основному із сечової кислоти, рідше – із її амонієвої або натрієвої солі. Вирішальне значення в їх утворенні має величина рН сечі, оскільки при її зниженні до 5,0 зменшується розчинність сечової кислоти – вона становить лише 60 мг/л, а при рН 7,0 – 1600 мг/л. Уратні камені у людей часто утворюються при різкому зростанні ендогенного утворення сечової кислоти в результаті розпаду нуклеопротеїнів.

Утворення каменів з кальцію, магнію і амонію фосфату (фосфатні камені), а також кальцію карбонату сприяє зрушення величини рН сечі в сечовому міхурі і ниркових мисках у лужний бік, що є наслідком розкладу сечовини до аміаку уреазою деяких мікроорганізмів (протей, стафілокок). Таким чином, інфекція є одним із провідних місцевих факторів утворення каменів.

Причини виникнення сечових каменів вивчені недостатньо, але ряд факторів, які сприяють їх утворенню все ж відомі. До цих факторів, окрім впливу мікроорганізмів, належать застій сечі, коли внаслідок травм нирок чи сечовивідних шляхів, природжених аномалій виникають морфологічні зміни у вигляді стриктур, стенозів чи гіпертрофічних розростань, які уповільнюють течію і надовго затримують сечу, створюючи умови для кристалізації солей. Сприяють виникненню каменів висока концентрація в сечі одного або кількох компонентів клубочкового фільтрату, яка зумовлена зменшенням діурезу, високою швидкістю екскреції речовин, які утворюють камінь або порушенням нормальної реабсорбції речовин із фільтрату; зміни величини рН сечі, відсутність інгібіторів.

Важливе значення в утворенні сечових каменів мають органічна основа та кристалізація солей на ній. В якості основи можуть бути мукополісахариди, уромукоїди, які виділяються клітинами каналців, мукопротеїни, які мають лужну реакцію, тому спричиняють розвиток уроциститу. Останні з'єднуються з кальцієм, утворюючи матрикс, на який потім осідають солі. Утворенню органічної основи ниркових каменів сприяють запальні процеси в нирках.

Кристалізація солей на органічному матриксі виникає внаслідок порушення співвідношення між кристалами мінеральних речовин і захисними колоїдами, які містяться в сечі. До них належать хондроїтинсульфати, муцини і сироватковий альбумін. З добовою сечею людей виділяється близько 1,0 г захисних колоїдів.

При патологічних процесах концентрація у сечі речовин, які виконують роль захисних колоїдів, зменшується, що є однією з причин кристалізації солей на органічному матриксі.

ТЕМА 7. КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

1. Біохімія злоякісного росту. Канцерогенез. Канцерогени і онкогени
2. Метаболізм речовин в організмі при злоякісному рості
3. Біохімічні методи діагностики злоякісних пухлин

Біохімія злоякісного росту. Канцерогенез. Канцерогени і онкогени

У тварин і людини ріст зумовлений поділом клітин, збільшенням їхніх розмірів і маси міжклітинної речовини. Сукупність процесів у клітині, що відбуваються при її підготовці до поділу та протягом мітозу, називається *клітинним циклом*. Він складається з інтерфази, яка включає три періоди: пресинтетичний, синтетичний і постсинтетичний, та, власне, мітозу. У нормі в більшості клітин тваринного організму клітинний цикл завершується приблизно через 20 годин.

Злоякісний ріст визначають як місцевий, автономний і нерегульований ріст тканин. Це означає, що ріст пухлин нічим не обмежений, не регулюється відповідними механізмами організму. Отже, вирішальною властивістю, що визначає пухлинний характер клітини, є автономність. Із функцій нормальних клітин формуються функції органів і тканин усього організму. На противагу цьому пухлинні клітини морфологічно і функціонально є чужорідними (сторонніми) тілами, тому що вони не беруть участі в утворенні органів і тканин організму. Саме морфологічне і функціональне виключення їх з організму, як цілісної інтегральної системи, є суттю пухлинної автономності і основним компонентом пухлинного фенотипу. Автономні ракові клітини зв'язані із життєдіяльністю організму, очевидно, тільки через кров'яне русло. У свою чергу проліферуючі пухлинні клітини впливають на тканини організму-пухлиноносія, спричиняють їх загибель, а продукти руйнування використовують як поживні речовини.

Злоякісний ріст розвивається в часі: спочатку він уражує невелику ділянку тканини, а пізніше розповсюджується на весь організм (найчастіше шляхом метастазів). Клітини пухлин мають значно менший клітинний цикл, порівняно зі здоровими.

Канцерогенез. Канцерогени. Процес надмірного патологічного розростання тканин з утворенням злоякісних ракових пухлин називається *канцерогенезом*. Злоякісний ріст спричиняють *канцерогени* – речовини, які за певних умов можуть викликати розвиток ракових пухлин. Канцерогенним впливом відзначаються віруси, деякі хімічні речовини та опромінення.

Доведено, що фрагменти вірусів, зокрема вірус саркоми Рауса, можуть стати причиною виникнення злоякісного росту (*вірусний канцерогенез*). Існують і онкогенні (пухлинотворні) віруси. Це група різномірних за будовою вірусів, що спричиняють появу доброякісних і злоякісних пухлин та лейкозів у тварин. Вони належать до ДНК- або РНК-вмісних вірусів. На відміну від інфекційних вірусів, онковіруси не руйнують клітин організму посиленням розмноження, а спричиняють перетворення клітин у пухлинні. При цьому можлива інтеграція вірусного геному з клітинним для передачі клітинам генетичної інформації. РНК-вмісні пухлинні віруси за допомогою ферменту ревертази (зворотної транскриптази) синтезують ДНК, здатну вбудовуватися у клітинний геном.

Виявлено вірусні гени (*онкогени*) та їхні білкові продукти (*онкобілки*), які відповідають за злоякісну трансформацію клітин. Пухлинні віруси, як правило, передаються макроорганізму в період ембріонального розвитку і залишаються надовго в латентному стані. Онкогени відкриті в геномах ретровірусів, тобто вірусів із РНК-овим геномом, як певні ділянки нуклеїнових кислот, які здатні індукувати різні злоякісні пухлини у тварин і птиці. Ці блоки нуклеотидів дістали назву *онкогенів*. Класичним представником онкогенного провірусу є вірус саркоми Рауса, що викликає саркому в курей. Геном його простий і складається із трьох структурних генів, необхідних для репродукції вірусу, та одного онкогена, – гена сарк, специфічною функцією якого є індукція пухлин – сарком. На сьогодні відомо, що онкогени консервативні. Час їхньої фізіологічної активності припадає на ранній ембріогенез. Тому вважають, що онкогени відіграють роль у певних важливих життєвих функціях, а онкогенний ефект є побічною дією цих генів. Таким чином, функціонування онкогенів у нормі є частиною програми ембріонального розвитку. Злоякісне перетворення клітини пов'язане з реактивацією цієї програми. Під дією інфекційних вірусів, радіації, хімічних канцерогенів, гормонів пухлинні віруси можуть активізуватися і сприяти розвитку пухлин.

Хімічними канцерогенами є сполуки, які після проникнення в організм зумовлюють злоякісний ріст. На сьогодні відомо більше 500 хімічних канцерогенів. Найкраще вивчені з них належать до поліциклічних ароматичних вуглеводнів, ароматичних амінів, нітрозосполук, алкалоїдів, токсинів, солей. Різні за своєю хімічною природою канцерогени в організмі тварин і людини зазнають метаболічної активації, тобто переходять із проканцерогенів у

канцерогени. Унаслідок такого перетворення утворюються продукти, які зв'язуються зі структурою ДНК.

В активації канцерогенів беруть участь цитохром Р-450, оксидази, епоксигідролаза, ферменти кон'югації (глюкуроніл-, сульфо- і глутатіонтрансферази) з утворенням однакових метаболітів. Майже всі відомі канцерогени ковалентно взаємодіють із нуклеофільними (тобто такими, що віддають субстрату свою електронну пару, за допомогою якої утворюється новий зв'язок) групами (-SH, -OH, =NH) білків і нуклеїнових кислот. Комплекси, які виникають, несприятливо впливають на різні функції клітини. Пошкоджена клітина може загинути, виправити дефект, що утворився, або перетворитися в мутантну, яка трансформується в пухлину.

Фізичний канцерогенез виникає під впливом різних видів опромінення (ультрафіолетового, рентгенівського, α -частинками, протонами чи нейтронами). Молекулярні механізми фізичного канцерогенезу ще не до кінця з'ясовані. Вважається, що радіація уражує молекули ДНК, унаслідок чого виникає соматична мутація. Інтенсивність ураження залежить від дози.

Згубну дію на організм тварин мають радіонукліди. Радіоактивні елементи (йод, цезій, стронцій та ін.) поглинаються тканинами і руйнують їх. Бластомогенна (новоутворювальна) дія радіації є найбільш небезпечним наслідком опромінення. Дози, які в початковий період не спричиняють видимих змін, можуть становити загрозу у відношенні індукції пухлин. Пухлиноутворююча дія радіоактивного цезію (^{137}Cs) характеризується широким спектром злоякісних новоутворень. У дослідних тварин реєстрували лейкози, пухлини кишечника, легень, нирок, печінки, скелета, залоз внутрішньої секреції, молочних, підшкірної клітковини та інших органів. Пухлини найчастіше виникають у тканинах безпосередньо в місцях депонування радіонуклідів.

Клінічні спостереження показують, що для переродження нормальної клітини в пухлинну дії однієї причини недостатньо. Найчастіше трансформовані клітини виникають унаслідок впливу багатьох зовнішніх факторів, які взаємодіють з їхніми структурними компонентами. Злоякісні процеси, які виникають на генетичному ґрунті, займають незначну кількість від загальної кількості випадків злоякісного росту, хоча спадкова схильність до розвитку пухлин у тварин може відігравати певну роль у виникненні ракових новоутворень. Так, описано чотири випадки остеосарком у собак породи ньюфаундленд кілька випадків захворювання на цю пухлину однієї лінії собак породи сенбернар. Усі тварини були близькими родичами.

Вважають, що канцерогенез є, принаймні, двостадійним. Протягом першої фази канцерогенезу канцероген (хімічний, променевий, вірусний) взаємодіє з нуклеїновими кислотами, зумовлюючи пошкодження, насамперед, генетичного

характеру. Порушення геному клітин, що лежать в основі канцерогенезу, відбувається як на рівні мутацій, так і на рівні хромосомних перебудов. Канцерогени утворюють ковалентні зв'язки з певними групами пуринових і піримідинових основ молекул ДНК. Крім ковалентних, можуть виникати зв'язки з вільними радикалами, здатними реагувати з усіма макромолекулами клітин. Відбуваються також реакції алкілювання атомів відповідних основ нуклеотидів, тобто включення алкілу в молекулу органічної сполуки. Після цього настає гідроліз N-глікозидних зв'язків. Потім розщеплюється й уражений ланцюг ДНК.

Метаболізм речовин в організмі при злоякісному рості

Проблема злоякісних пухлин є передусім проблемою росту. Як відомо, усі хімічні процеси в тканинах проходять в умовах динамічної рівноваги. Стан такої рівноваги залежить від багатьох факторів: типу реакції та природи реагуючих речовин, періоду розвитку тканини, фізичних властивостей середовища та ін. Для нормальної життєдіяльності тканин організму необхідне безперервне постачання його енергією. Основними складовими компонентами тканин, які забезпечують їхнє функціонування, є білки, полісахариди, ліпіди й нуклеїнові кислоти. Вони разом із низькомолекулярними речовинами визначають будову і властивості клітин. Стан рівноваги в перетвореннях цих сполук у різні фази розвитку організму може зсуватися в бік синтезу або розпаду. Так, у період ембріонального розвитку, на ранніх фазах постембріонального життя, при звичайних регенераційних процесах швидкість синтезу перевищує швидкість розпаду органічних сполук. За нормальних умов цей стан на певному етапі припиняється і створюються постійні умови, при яких величини швидкості синтезу й розпаду стають приблизно однаковими. У процесі злоякісного росту цей врівноважений стан змінюється, і швидкість синтезу сполук постійно перевищує швидкість їхнього розпаду. Чим викликаний такий стан – відсутністю механізмів, що контролюють ріст, чи їхньою неефективністю в пухлинних клітинах, ще не з'ясовано.

Зміни метаболізму в пухлинах відбуваються в кількох напрямках і проявляються як окиснення глюкози, збільшення біосинтезу нуклеотидів, порушення циклу утворення сечовини та ін.

Обмін вуглеводів. Класичними дослідженнями Варбурга (1930) показано, що для пухлин характерний аеробний гліколіз, тобто ракові клітини в присутності кисню здатні продукувати молочну кислоту. Аеробний гліколіз властивий також ембріональній тканині. Однак після її дозрівання процес гліколізу затухає, а в ракових клітинах він прогресивно наростає, що супроводжується надмірним гліколітичним утворенням АТФ і можливістю необмеженої проліферації. Рівень

аеробного гліколізу в більшості пухлин є високим, проте він завжди менш інтенсивний, ніж анаеробний гліколіз. Вважають, що гліколіз є основним джерелом енергії пухлинних клітин. У пухлинах виявлено високу концентрацію АТФ і дуже низьку кількість АДФ. У них нагромаджується велика кількість молочної кислоти (у 30 разів більше норми), що призводить до швидкого зниження величини рН. Наприклад, рН у клітинах печінки дорівнює 7,4, а в гепатомі – 7,0. У пухлинних клітинах інтенсивність утворення гексозофосфатів підвищена й одночасно виключена можливість їхнього розщеплення, оскільки фосфатази є неактивними. Це дозволяє пухлинній клітині більш повно використовувати гексозофосфати, порівняно з нормальною. Отже, гліколіз, крім енергетичного забезпечення, може відігравати значну роль у постачанні клітині метаболітів – попередників нуклеотидів. У ракових клітинах окиснення глюкози активується пентозофосфатним шляхом і спостерігається підвищене продукування рибозо-5-фосфату, який є основним продуктом для синтезу нуклеїнових кислот.

Обмін білків. Дослідження нормальних і пухлинних тканин показали, що їхні білки дуже схожі. Проте синтез білків у пухлинній клітині дещо відрізняється від синтезу білка нормальної клітини. Так, у пухлинах посилюється утворення ядерних білків (гістонів), необхідних для функціонування нуклеїнових кислот. У крові тварин-пухлиноносіїв різко порушується співвідношення альбумінів і глобулінів. Численними дослідженнями доведено зменшення вмісту альбумінів і збільшення фракції глобулінів. При зворотному розвитку пухлин уміст альбумінів і глобулінів повертається до норми. Для пухлинних клітин характерний синтез модифікованих та неспецифічних білків. Так, в альбуміні онкологічно хворих виявлено постсинтетичні модифікації на багатьох амінокислотних залишках (цистеїну, тирозину, лізину, аспарагінової кислоти). Ці зміни пов'язані як із глікозилюванням, так і з фруктозилюванням амінокислот альбумінів.

Пухлинні клітини секретують парапротейни – білки типу імуноглобулінів (Ig), які виявляються у значній кількості на електрофореграмі в ділянці γ -, β - або α_2 -глобулінів. Із крові хворих на злоякісні пухлини тварин і людей виділена субфракція імуноглобулінів G, яка має притаманні їй особливості складу, структури, конформації, фізико-хімічні властивості, а також антигенну специфіку. Ця субфракція Ig G названа маркером росту.

У процесі злоякісного росту спостерігається порушення функцій протеолітичних ферментів та їхніх інгібіторів. Причому, зміни протеолітичної активності мають неоднакову спрямованість на різних стадіях розвитку пухлинного процесу. На ранніх етапах росту пухлин виявляється, як правило, активація протеолізу, а в період метастазування пухлин внаслідок підвищення

рівня плазмових інгібіторів (α_2 -макроглобуліну, інгібітора трипсину) протеолітична активність зменшується.

Клітини злоякісного росту безконтрольно й інтенсивно поглинають із крові амінокислоти, через що пухлинну клітину називають “пащею для амінокислот”. Наслідком цього є швидкий ріст пухлинних клітин і негативний вплив на амінокислотне забезпечення нормаль-них клітин. В організмі тварин-пухлиноносіїв виникає від’ємний азотистий баланс, зменшується маса тіла і, нарешті, розвивається кахексія. У пухлинній клітині порушується обмін окремих амінокислот (триптофану, лізину та ін.) і змінюється швидкість їхнього включення в білки; підвищується активність амінотрансфераз. У хворих тварин знижується біосинтез сечовини. Механізм синтезу сечовини, типовий для нормальної клітини печінки, у гепатомі відсутній. Проте вміст сечовини в гепатомах, як і в ембріональній тканині, приблизно у два рази вищий, ніж у нормальній печінці. Сечовина в цих патологічних клітинах утворюється, можливо, у результаті дії аргінази на аргінін, який з’являється внаслідок розпаду тканинних білків або надходить із кров’ю. Активність аргінази в гепатомах, порівняно з нормальною печінкою, знижується. У пухлинах виявлені порушення обміну хромопротейнів, які пов’язані з тим, що пухлини поглинають значну кількість заліза, зумовлюючи зниження концентрації гемоглобіну та порушення синтезу інших залізовмісних білків (каталаза, цитохроми та ін.).

Обмін нуклеїнових кислот. У пухлинних клітинах виявлено високий уміст нуклеїнових кислот. Причому, кількість ДНК переважає РНК і є вищою, ніж у нормальній тканині. У ракових клітинах знижений біосинтез пуринових і піримідинових основ, що створює умови для появи нуклеїнових кислот, які якісно відрізняються від нуклеї-нових кислот нормальних тканин. Однак суттєвої різниці в будові нуклеїнових кислот пухлинних і нормальних тканин не виявлено. Проте є дані, що нуклеїнові кислоти пухлин та інших тканин-пухлиноносіїв мають підвищений уміст гуаніну. Гуанін у хворому на ракові пухлини організмі є основним джерелом пуринів нуклеїнових кислот. Відомо також, що гуанін стимулює ріст експериментальних пухлин. Аденін використовується пухлиною значно меншою мірою.

У пухлинах активність нуклеотидаз і нуклеозидаз, а також ферментів, що дезамінують пурини у складі нуклеотидів, є значно вищою, порівняно з нормою. Нуклеїнові кислоти пухлин більш інтенсивно розпадаються, ніж у здорових тканинах. Пухлини, подібно до нормальних тканин, перетворюють амінопурини в оксипурини, які далі окиснюються до кінцевих продуктів пуринового обміну.

Обмін ліпідів. Одним із важливих факторів, що змінюють гомеостаз в онкологічно хворих, є порушення ліпідного обміну. Зокрема, у крові хворих на

рак легень і шлунка виявили значно нижчу активність ліпопротеїнліпази, яка гідролізує ліпопротеїни.

До сьогодні не знайдено якихось специфічних ліпідів, які були б характерними лише для пухлинних клітин. Але у тканинах пухлин різної локалізації виявлено зміни вмісту фосфоліпідів, холестеролу, жирних кислот, а також фракційного складу ліпідів як у цілих клітинах, так і в субклітинних фракціях. Таким чином, структурні ліпіди, що утворюють цитоплазматичну мембрану в пухлинних клітинах, відрізняються від нормальних кількісними змінами. За своїм якісним складом ліпіди пухлин суттєво не відрізняються від таких же ліпідів нормальних тканин.

В організмі, ураженому злоякісним ростом, метаболізм нейтральних жирів не зазнає значних змін. Жири, які є резервними ліпідами, виконують функції джерела енергії. Їх розщеплення відбувається звичайним шляхом і регулюється гормонами. При підвищенні енергетичних потреб організму-пухлиноносія виснажуються запаси нейтральних жирів. Але при цьому концентрація кетонових тіл не підвищується, що вказує на аеробне окиснення продуктів гідролізу жирів до CO_2 і H_2O .

Обмін мінеральних речовин. Пухлинний ріст супроводжується суттєвим порушенням обміну металів. Так, при карциномі Герена та бластомогенезі відбувається різке збіднення печінки і м'язової тканини на залізо, а також крові на цинк. Злоякісний ріст викликає загальний дефіцит та перерозподіл між тканинами і пухлиною міді, кадмію, магнію, марганцю та заліза.

У пухлинах, як і в нормальній тканині, катіони K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} та відповідні їм аніони (Cl^- , HCO_3^- , фосфати) відзначаються найвищою осмотичною активністю. Вони беруть участь також у ферментативних реакціях (K^+ і Mg^{2+}) та регулюють метаболічні процеси (Ca^{2+}). У цих випадках вони виконують вказані функції в більш низькій концентрації, ніж у нормальних тканинах. У пухлинній тканині підвищується вміст Na^+ , Ca^{2+} і частково – K^+ та значно знижується концентрація Mg^{2+} . У некротично зміненій пухлинній тканині звільняються жирні кислоти, які утворюють з Ca^{2+} нерозчинні солі (мила) і в такий спосіб неспецифічно збільшують концентрацію кальцію. Часто спостерігається дефіцит заліза, що спричинює виникнення анемії.

У пухлинах, особливо в їхній сполучній тканині, завжди виявляється підвищена кількість води. Однак це не є типовим лише для пухлин, оскільки таке явище спостерігається в молодих і швидкозрослих тканинах.

Незважаючи на численні біохімічні дослідження, до сьогодні не вдалося виявити якісні відмінності метаболізму пухлинних клітин, які їх би відрізняли від нормальних. Усі виявлені зміни мають кількісний характер і стосуються змін концентрації сполук, активності ферментів, розмірів транспорту та інших

величин, які виявляються в клітинах обох типів. З цього можна зробити висновок, що зазначені зміни зумовлюються порушенням регуляції метаболізму в пухлинних клітинах унаслідок їх виходу з-під генетичного контролю. Розмноження пухлинних клітин відбувається за законами саморегуляції.

Біохімічні методи діагностики злоякісних пухлин

Пошкодження пухлиною різних органів і його вплив на загальний стан організму можуть викликати зміни багатьох лабораторних показ-ників, які є характерними не лише для онкологічних хвороб (наприклад, білірубінемія при раку жовчовивідних шляхів чи підшлункової залози). Часто загальні і неспецифічні прояви, наприклад лихоманка, анемія, гіпопротеїнемія і зростання швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ), можуть бути першими виявленими показниками пухлинного процесу. Частота появи цих змін є дуже низькою на початкових стадіях онкологічної хвороби і зростає до 100 % на пізніх стадіях. У таблиці 13 показано частоту виникнення змін деяких лабораторних показ-ників при різних пухлинах у момент виявлення, що має місце на різних стадіях їх розвитку.

Рівень загального білка та альбуміну в плазмі, як правило, є зниженим на пізніх стадіях пухлинного процесу. Причина цього явища полягає у комплексній дії ряду чинників, таких, як втрата апетиту, порушення всмоктування, пошкодження білкового синтезу через метастази в печінку, посилення катаболізму білків.

У 10 % хворих на рак виникає гіперкальціємія, яка в більшості випадків пов'язана з метастазами у кістки, що веде до вимивання кальцію в позаклітинну рідину. Гіперкальціємія в поєднанні із гіпофосфатемією без метастазів у кістки найчастіше свідчить про наявність пухлини прищитоподібних залоз. Висока концентрація Ca^{2+} у крові може гальмувати реабсорбцію K^{+} у ниркових каналцях, що веде до частого поєднання гіперкальціємії та гіпокаліємії.

Пухлинна гіпоглікемія пов'язана з доброякісними β -клітинами підшлункової залози чи мезенхімальними пухлинами (фібросаркома, нейрофіброма). У першому випадку гіпоглікемія виникає через надмірну продукцію та неконтрольоване виділення інсуліну. У другому випадку вона спричинюється поліпептидами з гіпоглікемічною дією, що продукуються мезенхімальними пухлинами. Ці поліпептиди мають зовсім іншу будову, ніж інсулін, і не взаємодіють з антитілами проти інсуліну.

Захворювання шлунка і кишечника, у тому числі пухлинні, можуть зумовлювати кровотечу у травному каналі. Гемоглобін, який вивільняється з еритроцитів, має активність пероксидази, що виявляється в калі за допомогою

бензидинового чи гваяколового тесту. Є також імунохімічні тести, які ґрунтуються на використанні антитіл проти гемоглобіну. Вони є зручними у використанні і дають високовірогідні показники. Найбільший відсоток позитивних результатів дає кровотеча з кінцевих відділів травного каналу. Маркером пухлини шлунка є велика кількість молочної кислоти у його вмісті.

Вищеописані показники лабораторних досліджень є опосередкованими маркерами при злоякісному рості, оскільки зміни вмісту їх зумовлені реакцією нормальної тканини на розвиток новоутворень.

Біохімічними дослідженнями виявлено, що в процесі злоякісного росту змінюється концентрація або біологічна дія більше ніж 120 різних сполук, які дістали назву пухлинних маркерів. Дослідження справжніх пухлинних маркерів (речовини, підвищений уміст яких можна пов'язати з наявністю і розвитком пухлинних клітин) дозволяє виявити пухлину ще до появи клінічних ознак захворювання. При цьому слід зазначити, що чутливість тесту залежить від стадії пухлинного процесу. На ранніх стадіях хвороби рівень більшості маркерів зростає лише в незначній частині випадків. До “пухлинних маркерів” належать ферменти, пухлино-ембріональні антигени, плацентарні та сироваткові білки, поліаміни та ін. Однак виявилось, що більшість із них властиві не тільки пухлинній прогресії, а й з'являються також у процесі ембріогенезу, регенерації тканин, гіпертрофії та дії гормонів росту. Тому лише частина пухлинних маркерів знайшла широке практичне клінічне застосування. До таких біохімічних тестів належить визначення активності ферментів та їхніх ізоформ, поліамінів і білків.

Щодо дослідження ферментів, то на сьогодні досить висока інформативність збереглася для загальної активності кислої фосфатази. Тест застосовується при діагностиці раку простати.

При злоякісних пухлинах цінним виявилось визначення ізоферментного спектра окремих ферментів. Як відомо, молекули ізоферментів неоднорідні й містять поліпептидні ланцюги, що кодуються різними структурними генами. У процесі нормального онтогенезу склад ізоферментів постійно змінюється. У період клітинної диференціації відбувається заміна ембріональних ферментів на форми, що відповідають тканинам дорослого організму. Канцерогенез супроводжується порушенням синтезу білка, унаслідок чого в дозрілих тканинах знову з'являються ембріональні форми ізоферментів, які, таким чином, можуть слугувати показником виникнення злоякісного росту. Клінічне значення мають ізоферменти гексокінази та лактатдегідрогенази.

У тканинах тварин виявлено чотири основні ізоформи гексокінази (ГК₁, ГК₂, ГК₃, ГК₄). Ізоферменти ГК₁, ГК₂ і ГК₃ близькі за своїми властивостями, тому їх об'єднують під загальною назвою “гексокіназа”, тоді як ГК₄ відома як глюкокіназа. Результати дослідження ізоферментів гексокінази показали, що в

злоякісних пухлинах мозку, печінки, матки, шлунка, у лімфоцитах при лімфолейкозі переважаючою стає ембріональна форма ферменту – ГК₂. Тому ізофермент ГК₂ використовується як маркер малігнізованих тканин.

Виділено п'ять ізоферментів лактатдегідрогенази: ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄, ЛДГ₅. Два з них є справжніми, тому що кодуються різними генами, а три – їхніми гібридними формами. Справжні ізоферменти ЛДГ₁ і ЛДГ₅ локалізуються в різних тканинах. ЛДГ₁ переважно знаходиться в м'язах серця, а ЛДГ₅ – у скелетних м'язах. Ознакою злоякісного росту є зрушення спектра ЛДГ в бік збільшення малорухоливих форм, які характеризуються найвищим умістом субодиниць – ЛДГ₅ і ЛДГ₄.

Біологічним рідинам хворих на злоякісні пухлини властива підвищена активність процесів біосинтезу поліамінів. Поліаміни (спермін, спермідин, путресцин) є регуляторами внутрішньоклітинного метаболізму. Подібно до моноамінів поліаміни утворюються шляхом декарбоксилювання амінокислот, і їхній метаболізм пов'язаний із багатьма важливими перетвореннями амінокислот.

Поліаміни необхідні для росту всіх клітин. При фізіологічній концентрації вони є стимуляторами росту, а при підвищеній кількості – інгібіторами. Роль поліамінів як стимуляторів росту особливо яскраво проявляється у процесі ембріогенезу та регенерації тканин. Експериментальний і клінічний матеріал свідчить, що розвиток пухлин супроводжується підвищенням кількості поліамінів в організмі-пухлиноносії. Тому накопичення поліамінів є характерною, хоча і неспецифічною рисою пухлинного росту. Виявилось, що збільшення вмісту одного або кількох поліамінів може відбуватися при деяких захворюваннях непухлинної природи, при яких має місце посилена клітинна проліферація (анемії, ревматоїдні артрити, гепатити, уремії та ін.). Це, безумовно, знижує діагностичну цінність визначення концентрації поліамінів. Однак, незважаючи на свою неспецифічність, поліамідний тест є одним із важливих біохімічних маркерів злоякісного росту.

Пухлинні процеси супроводжуються значним збільшенням синтезу деяких білків, а також появою нових антигенів у крові тварин і людини. Прикладом різкого підвищення рівня сироваткового вмісту антигенів при пухлинах є залізовмісний білок феритин, що дозволило його використовувати як маркер пухлинного процесу при злоякісних захворюваннях крові, печінки, нирок і молочної залози.

У крові хворих на злоякісні пухлини виділено імуноглобулін G, названий маркером росту. Хоча білок-маркер росту з'являється у крові тварин і людини за різних форм, локалізації й етіології пухлин, при тільності та лейкозах великої

рогатої худоби він має багато однакових параметрів. У той же час виявлено й певні відмінності між білком-маркером росту злоякісних і нормальних тканин.

Метод ранньої діагностики з використанням білка-маркера росту базується на здатності IgG злоякісного росту утворювати в кислому середовищі нерозчинні комплекси із сироватковими α -глобулінами, присутніми в крові як здорових, так і хворих тварин-пухлиноносіїв. Достовірність діагностики ранніх форм злоякісних пухлин за допомогою визначення імуноглобуліну G, характерного для злоякісного росту, досягає 95 % випадків.

Як пухлинні маркери використовується ще ціла низка білків, які з'являються при злоякісному рості (β -фетопротейн, β -хоріогонадо-тропін, β_2 -мікроглобулін, β -онкофетальний антиген, епітеліальний кишковий антиген, нейроспецифічна енолаза). Визначення рівня хоріонічного гонадотропіну в сечі чи сироватці крові використовується як тест на вагітність (чутливість – 100 %). У невагітних самок зростання рівня хоріонічного гонадотропіну вказує на наявність пухлини. Рівень гормону в сироватці крові зростає при первинних пухлинах сечового міхура, легенів, підшлункової залози.

Підсумовуючи сказане, слід зазначити, що дослідження в галузі біохімії раку до сьогодні не виявили істотних відмінностей у хімізмі пухлинних і нормальних клітин. Більшість виявлених змін мають кількісний характер або стосуються порушень співвідношення між окремими метаболітами чи структурними компонентами клітин. Однак біохімічні тести злоякісного росту в поєднанні з іншими методами діагностики дозволяють виявляти ранні етапи виникнення пухлинного процесу, а також контролювати ефективність його ліквідації. Це має практичне значення і для ветеринарної медицини, оскільки пухлини широко розповсюджені у тварин усіх видів, у тому числі домашніх. І хоча значення пухлинної патології у тварин і людини є неадекватним, проблема злоякісних утворень у ветеринарній медицині також є досить актуальною. Клінічна ветеринарна онкологія набуває все більшого значення у зв'язку із широким розповсюдженням пухлин серед сільськогосподарських тварин, які завдають значних економічних збитків, оскільки знижують м'ясну й молочну продуктивність, порушують процеси відтворення, спричиняють вимушений забій тварин-пухлиноносіїв або їхню загибель.

Доречно також зазначити, що багато методів діагностики й лікування пухлин, що успішно застосовуються в медичній практиці, експериментально розроблені на тваринах. Однак лікарі ветеринарної медицини або зовсім не використовують їх, або мало про них поінформовані. Але, враховуючи те, що при ранньому виявленні пухлин у тварин у багатьох випадках можна досягнути позитивного лікувального ефекту, можемо стверджувати, що такі знання для

лікарів ветеринарної медицини є вкрай необхідними. Це допоможе їм брати участь у вирішенні практичних завдань ветеринарії.

Список використаних джерел

1. Ветеринарна біохімія: підручник / Томчук В. А., Грищенко В. А., Цвіліховський В. І. – К.: НУБіП України, 2022. – 376 с.
2. Сибіль М.Г. Клінічна біохімія: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів фізкультурного профілю. – Л. : ЛДУФК, 2015. – 228 с.
3. Клінічна біохімія: підручник / За ред. Луньової Г.Г. Видавництво: Магнолія. 2023 р. Т. 1. 316 с.
4. Клінічна біохімія: підручник / За ред. Луньової Г.Г. Видавництво: Магнолія. 2023 р. Т. 1. 372 с.
5. Клінічна біохімія: підручник / За ред. Луньової Г.Г. Видавництво: Магнолія. 2023 р. Т. 3. 296 с.
6. Аналітичні методи досліджень. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів / Войціцький В.М., Хижняк С.В., Грищенко В.А., Томчук В.А., Баранов Ю.С. – К.: ЦП «Компринт», 2017. – 268 с.
7. Аналітичні методи досліджень. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посібн. [для студ. вищ. навч. зал.] / [Мельничук Д.О., Мельничук С.Д., Войціцький В.М. та ін.]; за ред. Д.О. Мельничука. – Київ: НУБіП України, 2016. – 289 с.
8. Спеціальна біохімія: навч. посібник [для студ. вищ. навч. зал.] / [Мельничук Д.О., Грищенко В.А., Томчук В.А. та ін.]; за ред. С.Д. Мельничука. – Київ: НУБіП України, 2015. – 648 с.