

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*

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до самостійної роботи 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



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 № 10 від 19.12. 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»

Методичні рекомендації до самостійної роботи 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. 69 с.

В Методичних рекомендаціях висвітлені питання загальної клінічної біохімії та клінічної біохімії при патології окремих органів і систем з метою закріплення теоретичних і практичних навичок з проведення клініко-лабораторних досліджень різноманітного біологічного матеріалу, отриманого від хворих тварин, та вірної інтерпретації результатів цих досліджень.

© ЗВО ПДУ, 2023

ЗМІСТ

Вступ	4
ТЕМА 1. Патобіохімія білкового, вуглеводного та ліпідного обмінів	5
ТЕМА 2. Діагностика порушень активності індикаторних і неспецифічних ензимів в органах і тканинах організму тварин	17
ТЕМА 3. Ізоферменти та їх роль у лабораторній діагностиці.....	23
ТЕМА 4. Метаболічні, біосинтетичні, дезінтоксикаційні та екскреторні функції печінки в нормі та при патології	28
ТЕМА 5. Біохімія і патобіохімія крові.....	37
ТЕМА 6. Клінічна біохімія хвороб нервової та сечової системи.....	49
ТЕМА 7. Клінічна біохімія злоякісних пухлин.....	63
Список використаних джерел	69

ВСТУП

Дисципліна «Сучасні біохімічні методи досліджень у ветеринарній медицині» є вибірковою компонентою науково-фахового спрямування освітньо-наукового ступеня «Доктор філософії» на базі ОС «Магістр» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина».

Мета вивчення предмету є формування цілісного уявлення про біохімічні та молекулярно-біологічні механізми функціонування організму тварин в нормі та при патологічних процесах, методи діагностики та шляхи корекції патологічних процесів за допомогою біомолекул та фізіологічно-активних речовин.

Предметом вивчення навчальної дисципліни є біохімічні процеси в організмі в нормі та при різних захворюваннях, молекулярні механізми формування патологічних станів, на яких базуються принципи та методи їх лабораторної діагностики, прогнозування та контролю перебігу захворювань, новітні досягнення в галузі клінічної біохімії та лабораторної діагностики.

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

ТЕМА1. ПАТОБІОХІМІЯ БІЛКОВОГО, ВУГЛЕВОДНОГО ТА ЛІПІДНОГО ОБМІНІВ

Анотація: У розділі розкрито найбільше важливі і специфічні функції білків, перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті, порушення перетравлення білків і реабсорбції амінокислот; вуглеводний обмін в організмі; порушення обміну вуглеводів, методи діагностики; біологічна роль ліпідів, їх перетравлювання та всмоктування, порушення обміну ліпідів.

Біологічна роль білків.

Роль білків в організмі різноманітна, але з усього цього різноманіття можна виділити *найбільше важливі і специфічні функції білків.*

1. *Каталітична функція.* Усі хімічні процеси в організмі здійснюються тільки при участі біологічних каталізаторів - ферментів, що є білками.

2. *Структурна функція.* Це функція побудови тваринного організму. Білки в організмі є скрізь. У комплексі з ліпідами білки беруть участь в утворенні мембран клітин. Важливими структурними білками є колаген у сполучній тканині, еластин у судинній стінці й у шкірних покровах тощо.

3. *Транспортна функція.* Найбільше характерна для білків крові і складається в переносі речовин або окремих хімічних угруповань в організмі.

4. *Захисна функція.* Ця функція реалізується, насамперед, антитілами - речовинами білкової природи, що продукуються імунною системою у відповідь на вторгнення в організм патогенних мікробів.

Захисною також є здатність білка крові фібриногену звертатися при пораненнях кровоносних судин, перешкоджаючи кровотечі.

5. *Регуляторна функція.* У регуляції обміну речовин беруть участь гормони. Ряд гормонів є речовинами білкової природи.

6. *Енергетична функція.* Ця роль білків для організму малозначна. Основну кількість енергії організм мобілізує з вуглеводів і ліпідів.

Перетравлення білків у шлунково-кишковому тракті

Для кожного живого організму характерна сувор специфічність його білків. Захист від чужорідних білків забезпечує його індивідуальність. Прикладом впливу чужих білків служать важкі алергічні реакції, аж до анафілактичного шоку і загибелі організму, при парентеральному введенні білкових препаратів без дотримання відповідних пересторог або, тим більше, вливанні несумісної іношогрупної крові.

Найменшими структурними одиницями білків, що не мають видової

специфічності, є амінокислоти.

Саме до окремих амінокислот і відбувається процес харчотравного розщеплення білків. Тільки амінокислоти в нормальних умовах надходять через слизову тонкого кишечника у кров. Починається процес розщеплення білків у сичугу жуйних або шлунку інших с.г тварин під дією ферменту пепсину і соляної кислоти. Соляна кислота: викликає набрякання білкової молекули, що збільшує її поверхню контакту зі харчотравними ферментами, активує пепсин, що виділяється в просвіт шлунка у вигляді свого - неактивного попередника - пепсиногена. створює оптимальну реакцію середовища в порожнині шлунка - рН менше 2, при якій пепсин має максимальну активність. Якщо соляної кислоти виділяється недостатньо (гіпоацидні, анацидні стани) і рН вище 2, то пепсин не виявляє активність. Це викликає, порушення харчотравних процесів у шлунку і веде до розвитку таких захворювань, як гастрити.

Пепсин розщеплює білки на окремі пептиди з 8 - 10 амінокислот. Сила розщеплюючої дії пепсину дуже велика, 1 г пепсину за 2 години може переварити до 50 кг білка яєчного альбуміну.

З шлунка харчова маса надходить у 12-палу кишку і тонкий кишечник. Підшлункова залоза створює лужне середовище і виділяє в кишечник ферменти трипсин і хімотрипсин. Ці ферменти розщеплюють окремі поліпептиди на уламки з 2-3 амінокислот. Коли суміш харчово-шлункового соку (хімус) потрапляє в тонкий кишечник, підшлункова залоза виділяє бікарбонат натрію для нейтралізації НСІ. Це допомагає захистити слизову оболонку кишечника. Тонкий кишечник також виділяє травні гормони, включаючи секретин і ССК, які стимулюють травні процеси для подальшого розщеплення білків. Секретин також стимулює підшлункову залозу до виділення бікарбонату натрію. Підшлункова залоза виділяє більшість травних ферментів, включаючи протеази трипсин, хімотрипсин та еластазу, які допомагають перетравленню білка. Разом всі ці ферменти розщеплюють складні білки на більш дрібні окремі амінокислоти, які потім транспортуються по слизовій оболонці кишечника для використання для створення нових білків, або для перетворення в жири або ацетил КоА і використовуються в циклі Кребса. Остаточне розщеплення до амінокислот відбувається під дією ферментів, що продукуються кишковою стінкою - пептид-гідролаз, відомих за назвою пептидаз. Вся група ферментів шлунково-кишкового тракту, що діють на білки корму, називається протеази (до гідролаз).

Щоб уникнути розщеплення білків, що входять до складу підшлункової залози і тонкого кишечника, ферменти підшлункової залози виділяються у вигляді неактивних проферментів, які активуються тільки в тонкому кишечнику. У підшлунковій залозі везикули зберігають трипсин і хімотрипсин як

трипсиноген і хімотрипсиноген. Після потрапляння в тонкий кишечник фермент, знайдений в стінці тонкої кишки, називається ентерокиназа, зв'язується з трипсиногеном і перетворює його в свою активну форму - трипсин. Потім трипсин зв'язується з хімотрипсиногеном, щоб перетворити його в активний хімотрипсин. Трипсин і хімотрипсин розщеплюють великі білки на більш дрібні пептиди, процес називається протеолізом. Ці менші пептиди катаболізуються в їх складові амінокислоти, які транспортуються по верхівковій поверхні слизової оболонки кишечника в процесі, який опосередкований транспортерами натрій-амінокислот. Ці транспортери зв'язують натрій, а потім зв'язують амінокислоту, щоб транспортувати її через мембрану. На базальній поверхні клітин слизової виділяється натрій і амінокислота. Натрій може бути повторно використаний в транспортері, тоді як амінокислоти переносяться в кров для транспортування в печінку і клітини по всьому тілу для синтезу білка.

Амінокислоти, що утворилися, усмоктуються через стінку тонкого кишечника і надходять у кров. По воротній вені вони приносяться в печінку, де частково перетворюються, використовуються для потреб самої печінки і для синтезу ряду специфічних для організму білків (білка плазми), а інша їх частина током крові розносяться по всьому організмі і використовується для синтезу власних білків у клітинах.

У вільному доступі амінокислоти використовуються для створення білків. Якщо амінокислоти існують в надлишку, організм не має можливості або механізму їх зберігання; таким чином, вони перетворюються в глюкозу або кетони, або вони розкладаються. Розпад амінокислот призводить до утворення вуглеводнів і азотистих відходів. Однак високі концентрації азоту токсичні. Цикл сечовини переробляє азот і сприяє його виведенню з організму.

Цикл сечовини - це сукупність біохімічних реакцій, які виробляють сечовину з іонів амонію з метою запобігання токсичного рівня амонію в організмі. Зустрічається в першу чергу в печінці і, в меншій мірі, в нирках. До початку циклу сечовини іони амонію виробляються в результаті розпаду амінокислот. У цих реакціях амінна група, або іон амонію, з амінокислоти обмінюється кето-групою на іншій молекулі. Ця подія трансамінування створює молекулу, необхідну для циклу Кребса, і іон амонію, який входить в цикл сечовини для усунення. У циклі сечовини амоній поєднується з CO_2 , в результаті чого утворюється сечовина і вода. Сечовина виводиться через нирки з сечею

Амінокислоти також можуть використовуватися як джерело енергії, особливо в періоди голодування. Оскільки обробка амінокислот призводить до створення метаболічних проміжних продуктів, включаючи піруват, ацетил КоА, ацетоацил КоА, оксалоацетат та α -кетоглутарат, амінокислоти можуть служити джерелом виробництва енергії через цикл Кребса

У тварин часто зустрічаються порушення перетравлення білків і реабсорбції амінокислот. У молодняка при гастритах унаслідок відсутності пепсину відбувається недостатнє перетравлення білків і настає гнильна диспепсія. При захворюваннях підшлункової залози в результаті зниженого виділення трипсину, хімотрипсину і карбоксиполіпептидази також можуть порушуватися процеси перетравлення білків.

Є також порушення біосинтезу білків крові, що призводять до утворення патологічних білків. Це може спостерігатися при неопластичних захворюваннях лімфоретикулярної системи (мієломі, рідше - лімфосаркомі і лимфоденозе). Крім набутих, бувають і уроджені порушення синтезу білків крові.

Порушення біосинтезу білків плазми, по теорії матричної гіпотези, пов'язані з відсутністю матриці РНК, тому виявляються патологічні білка плазми зі зміненою структурою. Ряд учених вважає, що відсутність утворення даної матриці обумовлено нестачею деяких ензимів, що беруть участь у біосинтезі РНК. При дефіциті білка в організмі виникають різноманітні порушення обміну речовин, затримується ріст, знижується продуктивність тварин.

Деякі білки з кишечника можуть всмоктуватися в незмінному вигляді і потрапляти в лімфатичні судини. Цей факт довго залишався дискусійним і лише за останні роки доведений імунологічними методами. Підтвердженням можливості проникнення в кров незмінних білків із харчотравного тракту служить фізіологічна, харчова (аліментарна) альбумінурія. Аліментарна протеїнурія спостерігається частіше у молодняка в неонатальний період при перевантаженні організму їжею, багатою білками - молоком.

Проникнення чужорідних білків і поліпептидів у кров тягне за собою розвиток алергічних станів. Виведення чужорідного білка і поліпептидів із сечею є захисною реакцією. Білки, що не переварилися, і високомолекулярні поліпептиди, всмоктавшись у кишечнику, потрапляють у кров і діють на організм як алергени. У молоці корів знаходиться біля 15 білків, кожний із яких може бути алергеном.

Участь центральної нервової системи в регуляції азотистого обміну починається з регуляції процесів перетравлення й усмоктування продуктів розпаду білків. У регуляції азотистого обміну беруть участь як умовно-рефлекторні механізми, так і безумовні рефлекси (виділення харчотравних соків вже при потраплянні їжі в роту порожнину). Регуляторні впливи центральної нервової системи здійснюються шляхом двосторонньої екстерорецептивного і інтерорецептивного зв'язку.

Зміни білкового обміну в тканинах при ураженнях та патологіях нервової системи характеризуються підвищеним розпадом білків і уповільненим їхнім ресинтезом, що веде до розвитку атрофії, дистрофій і інших порушень.

Розлади нервових механізмів ведуть до значних змін в азотистому обміні. Видалення великих півкуль головного мозку у тварин супроводжується падінням вмісту залишкового азоту.

Великий вплив на білковий обмін мають гормони. Гормони щитовидної залози посилюють процеси розпаду білків і підвищують швидкість відновлення білків. При гіперфункції щитовидної залози посилений розпад білків може призвести до негативного азотистого балансу.

Діагностика порушень обміну білків – колоїдно-осадові проби (реакції), це тимолова проба, сулемова проба, проба з сульфатом цинку, проба Вальтмана та інші.

Вуглеводний обмін в організмі.

Вуглеводний обмін - це сукупність процесів перетворення вуглеводів в організмі людини і тварин.

Процес перетворень вуглеводів починається з перетравлення їх в ротовій порожнині, де відбувається часткове розщеплення крохмалю під дією ферменту слини - амілази. В основному вуглеводи перетравлюються і всмоктуються у тонкому кишечнику, де полісахариди з допомогою ферментів розщеплюються до моносахаридів і потім з потоком крові разносяться в тканини і органи, а основна частина їх, головним чином глюкоза, накопичується в печінці у вигляді глікогену. Глюкоза з кров'ю надходить в ті органи або тканини, де виникає потреба в ній, причому швидкість проникнення глюкози в клітини визначається проникністю клітинних оболонок. В клітини печінки глюкоза проникає вільно, в клітини м'язової тканини проникнення глюкози пов'язано з витратою енергії; під час м'язової роботи проникність клітинної стінки значно зростає. При необхідності глікоген в процесі глікогенолізу перетворюється в фосфорілірований форму глюкози (фосфорний ефір глюкози). У клітинах глюкоза може зазнавати перетворення як анаеробно (гліколіз), так і аеробно (пентозний цикл). В процесі гліколізу на кожен молекулу расщепившейся глюкози утворюються 2 молекули аденозин-трифосфату (АТФ) та 2 молекули молочної кислоти. Якщо тканини достатньо забезпечені киснем, то піровиноградна кислота (проміжний продукт вуглеводного обміну, що утворюється в процесі анаеробного розпаду вуглеводів) не відновлюється до молочної, а окислюється в циклі трикарбонових кислот (див. біологічне Окислення) до CO_2 і H_2O з накопиченням енергії у вигляді АТФ у системі окислювального фосфорилування (див.).

При окисленні глюкози в пентозному циклі утворюється відновлений нікотинамід-адениннуклеотид-фосфат, необхідний для відновлювальних синтезів. Крім того, проміжні продукти пентозного циклу є матеріалом для

синтезу багатьох важливих сполук.

Регуляція вуглеводного обміну в основному здійснюється гормонами і центральною нервовою системою. Глюкокортикоїди (кортизон, гідрокортизон) гальмують швидкість транспорту глюкози в клітини тканин, інсулін (див.) прискорює його; адреналін (див.) стимулює процес сахарообранования з глікогену в печінці. Корі великих півкуль також належить певна роль в регуляції вуглеводного обміну, так як чинники психогенного характеру підсилюють утворення цукру в печінці і викликають гіперглікемію. Про стан вуглеводного обміну можна судити за вмістом цукру в крові (в нормі 70-120 мг%). При цукровому навантаженні ця величина зростає, але потім швидко досягає норми. Порушення вуглеводного обміну виникають при різних захворюваннях. Так, при нестачі інсуліну настає цукровий діабет. Зниження активності одного з ферментів вуглеводного обміну - м'язової фосфорилази - веде до м'язової дистрофії.

Порушення обміну вуглеводів, методи діагностики.

Порушення обміну вуглеводів на стадіях перетравлення і всмоктування спостерігається при хворобах рота, слинних залоз, шлунка, рубця (ацидоз, алкалоз, дистонія), кишечнику (ентерит, ентероколіт, хімоатаз, копростаз), підшлункової залози, синдромі діареї та багатьох інших захворюваннях, у тому числі інфекційної та інвазійної етіології. Зокрема, у шлунку соляна кислота відіграє роль антисептика, який попереджує зброджування вуглеводів. При ахлоргідрії і гіпохлоргідрії у шлунку і кишечнику створюються сприятливі умови для розвитку мікроорганізмів, що спричинюють бродіння, внаслідок чого утворюється молочна кислота.

При запаленні слизової оболонки тонкого кишечнику, запальних процесах підшлункової залози біосинтез ферментів, що здійснюють перетравлення вуглеводів (амілази, сахарази, лактази), або їх дія можуть порушуватись (ферментопатія). Це призводить до недостатнього розщеплення складних вуглеводів. За кишкової дисфункції (ентерит) гідроліз сахарози і мальтози знижується на 40–50 %, а лактози – більше ніж на 75 %. Подібні результати викликає гальмування ферментів інгібіторами (наприклад, солями важких металів). За неповного гідролізу в порожнині тонких кишок дисахариди потрапляють у товстий кишечник, де вони зазнають дії бактеріальної флори і зброджуються до молочної кислоти (реакція калу стає кислою). Сахароза, крім цього, здатна зв'язувати значну кількість води й утримувати її у кишечнику, в результаті чого проявляється основний симптом захворювання – пронос. Це ж відбувається у новонароджених телят, яким із настоями і відварами лікарських трав замість глюкози дають цукор. У кишечнику новонароджених відсутня

сахараза, тому сахароза не перетравлюється, підвищує осмотичний тиск і спричинює діарею.

Варті уваги й інші вікові особливості перетравлення вуглеводів у кишечнику. Зокрема, лактаза відзначається найвищою активністю в організмі молодих тварин, в організмі ж дорослих її активність знижується або й повністю відсутня. Тому згодовування молока таким тваринам, особливо кішкам, спричинює розвиток діареї.

У жуйних різкі зміни корму призводять до гіпотонії рубця і порушення процесів бродіння. Вторинна гіпотонія виникає при багатьох неінфекційних та інфекційних, гінекологічних та хірургічних хворобах. Унаслідок дистонії порушуються процеси травлення вуглеводів, зменшується вміст оцтової кислоти, збільшується кількість масляної, що спричинює посилення кетогенезу. При надмірній кількості легкокорозчинних вуглеводів (цукру, крохмалю) у раціоні в рубці продукується надмірна кількість молочної кислоти, яка не встигає перетворюватися на пропіонову і нагромаджується в рідині рубця (до 58 мг/100 мл, або 6,4 ммоль/л і більше). Карбонатів слини не вистачає для нейтралізації кислот. У результаті цього величина рН вмісту рубця знижується до 4,0–5,0, що спричинює припинення його моторики, пригнічення життєдіяльності бактерій та інфузорій рубця. Молочна кислота інтенсивно всмоктується в кров, де її концентрація досягає 40–80 мг/100 мл (4,4–4,8 ммоль/л) і більше (у нормі вона становить 1–1,5 ммоль/л) і вступає у взаємодію з буферними системами крові.

Унаслідок цього знижується резервна лужність крові – до 35 об% CO_2 , величина рН може знизитися з 7,4 до 7,15, що стає небезпечним для життя тварин.

Серед порушень вуглеводного обміну в людей вивчені вроджені спадкові захворювання, зумовлені відсутністю в слизовій оболонці кишечника ферментів, необхідних для гідролізу дисахаридів. Тому сахароза, лактоза, мальтоза та ізомальтоза не перетравлюються, що супроводжується посиленням бродіння в кишечнику, діареєю, зневодненням.

У тварин може порушуватися не лише перетравлення, а й всмоктування вуглеводів, що спостерігається, зокрема, при ентеритах, нестачі натрію, сповільненому синтезі білків-носіїв (при розладах біосинтезу білків), дефіциті АТФ. При кисневому голодуванні до клітин слизової кишок надходить менше кисню і в тканинах утворюється більше молочної кислоти, яка може блокувати процес проникнення цукрів (оптимальне значення рН для їх всмоктування в тонкому кишечнику становить 7,0–9,0). Швидкість всмоктування моносахаридів у кишечнику визначається інтенсивністю фосфорилювання, яке забезпечується енергією гліколізу в стінці кишечника. Порушення фосфорилювання, а отже і всмоктування моносахаридів, спостерігають при гіпофункції кіркової частини

надниркових залоз, коли у кров надходить мало глюкокортикоїдів.

Порушення перетравлення і всмоктування вуглеводів супроводжується недостатнім надходженням глюкози та інших енергетичних речовин до клітин і тканин, а при деяких хворобах (кетоз, ацидоз рубця) – надмірним утворенням і всмоктуванням із кишечника молочної, оцтової та масляної кислот, кетонових тіл.

Діагностика порушень обміну вуглеводів ґрунтується на аналізі раціонів та біохімічному дослідженні крові, сечі, вмісту рубця, калу.

Аналіз раціону передбачає вивчення кількості клітковини, цукру і крохмалю. Оптимальне надходження їх сприяє розмноженню в передшлунках жуйних корисних мікроорганізмів. Надлишок легкозварливих вуглеводів, особливо цукру, пригнічує активність мікрофлори передшлунків, знижує перетравність кормів, спричинює порушення кислотно-основного балансу в бік ацидозу, оскільки в рубці утворюється надмірна кількість молочної кислоти, величина рН його зменшується до 4,0–5,0. Нестача глюкози і крохмалю в раціоні може порушити білково-жировий обмін, що проявляється кетонемією і розвитком ацидозу. Тому при оцінці вуглеводної поживності раціону для жуйних необхідно контролювати цукро-протеїнове співвідношення і співвідношення цукор + крохмаль до перетравного протеїну, які, відповідно, мають становити для корів 1–1,2 і 2–2,5, тобто на 1 г перетравного протеїну необхідно 1,0–1,2 г цукру і 2–2,5 г цукру і крохмалю. Для овець цукро-протеїнове співвідношення має становити 0,5–0,9.

Нестача клітковини в раціоні пригнічує моторну функцію органів травлення, спричинює зниження утворення в рубці оцтової кислоти, необхідної для синтезу молочного жиру, зменшення синтезу вітамінів групи В, супроводжується розвитком ацидозу і паракератозу рубця, абсцесів печінки, сечокам'яної хвороби. Надлишок клітковини в раціоні також небажаний, оскільки знижуються поїдання тваринами кормів, перетравність і використання поживних речовин. Оптимальний рівень клітковини у сухій речовині раціону має становити:

– для сухостійних корів – 25–28 %, лактуючих корів з надоєм до 10 кг – 28; 11–20 кг – 27–24; 21–30 кг – 23–19, при надоеі більше 30 кг – 16–18 %;

– для телят 2–3-місячного віку – 6–12 %, 3–6-місячного – 14–18, старше 6-місячного – 22–24, для молодняку при інтенсивній відгодівлі – 16–20 %;

– для коней – 16 % сухої речовини раціону;

– для лактуючих свиноматок і кнурів – 6–8 %, неплідних і порісних свиноматок – 12–14, поросят 2–4-місячного віку – 4–5, старше 4-місячного віку – 6–7 %;

– вівцематок – 25–27 %, ягнят до 6-місячного віку – не більше 13, для

старшого молодняка – 20–25 %;

– хутрових звірів – 3–4 %, собак – 4–5 %;

– для курей-несучок – 5–6 %, індичок – 6, качок – 7, гусей – 10, молодняка яєчних курей – 5–7, курчат-бройлерів – 4,5 %.

Біохімічна діагностика порушень обміну вуглеводів включає дослідження різних субстратів. У крові визначають уміст глюкози, молочної та піровиноградної кислот, у печінці – вміст глікогену, сечі – глюкози і, можливо, галактози та фруктози, у вмісті рубця – величину рН, концентрацію коротколанцюгових жирних кислот та їхнє співвідношення. У калі досліджують наявність крохмалю, легкоотравної клітковини, вміст органічних кислот та реакцію калу.

Глюкозу визначають у крові, сироватці та плазмі. Вміст глюкози в крові і плазмі майже однаковий, проте швидко знижується внаслідок гліколізу. Тому визначають її не пізніше 2 год після взяття крові або швидко осаджують білки трихлороцтовою кислотою. Вміст глюкози в крові є відносно постійною величиною і залежить від виду та віку тварин.

Порушення вуглеводного обміну супроводжується зниженням рівня глюкози в крові (гіпоглікемія) або її підвищенням (гіперглікемія).

Біологічна роль ліпідів, їх перетравлювання та всмоктування.

Ліпідами (від грецьк. *lipos* – жир) називають фракції тваринних і рослинних тканин, що розчиняються органічними розчинниками. До ліпідів належать жири та жироподібні речовини. В організмі тварин вони є основними енергетичними речовинами: при повному розпаді з 1 г жиру виділяється 9,3 ккал енергії, що більше, ніж удвічі, порівняно з вуглеводами і білками. Енергозабезпечення організму за рахунок жирів відбувається в основному за дефіциту вуглеводів або в ситуаціях, які вимагають підвищених енерговитрат, що є особливо необхідним для міокарда. Окрім того, ліпіди виконують структурну функцію, оскільки є компонентами клітинних мембран усіх органів і тканин, різних біологічних комплексів. Важливими є захисна та метаболічна функція ліпідів: вони є розчинниками вітамінів А, Е, D, К та інших сполук, попередниками біологічно активних речовин – гормонів, вітамінів, жовчних кислот. Їм належить важлива роль і в обміні води (при окисненні 100 г жиру утворюється 107,1 г води).

За своїм складом ліпіди поділяються на дві основні групи – прості і складні. Молекули простого ліпиду утворюються із залишків спиртів (гліцеролу, вищих або циклічних) та вищих жирних кислот. До них належать нейтральні жири, головним чином триацилгліцероли і воски. Складні ліпіди, окрім простих жирів, у своїй молекулі містять інші речовини: азотисті основи, залишки вуглеводів, похідні ортофосфорної кислоти. Складними ліпідами є фосфоліпіди, гліколіпіди

і ліпо-протеїни.

Нейтральні жири – це складні ефіри триатомного спирту гліцеролу і жирних кислот; вони є насичені і ненасичені. Останні в хімічному відношенні більш активні, оскільки за місцем подвійного зв'язку до них може приєднуватися нова хімічна речовина. Ненасичені жирні кислоти, які мають більше одного подвійного зв'язку, в організмі не синтезуються і тому називаються незамінними (лінолева, ліноленова кислоти, що входять до складу вітаміну F, та арахідонова). Поліненасиченим жирним кислотам належить важливе значення у клінічній практиці при профілактиці атеросклерозу, оскільки вони зменшують уміст у плазмі крові ліпопротеїнів низької густини, які є транспортною формою холестеролу; відповідно знижується і концентрація холестеролу.

Стан обміну ліпідів залежить від складу раціонів, функції кишкового каналу, підшлункової і щитоподібної залоз, печінки та інших органів. Порушення обміну ліпідів виникають за нестачі чи надлишку жирів у раціоні, силосно-концентратного і висококонцентратного типів годівлі, недостатнього споживання сіна, згодовування неякісних кормів. У збалансованих раціонах молочних корів уміст жиру становить 2–4 %, телят – 5–8, молодняку старше шестимісячного віку – 3–4, кнурів і свиноматок – 2,5–3, поросят – 3–4 %. Тваринні жири з низькою точкою плавлення вводять до комбікорму курчат-бройлерів – до 5–8 % (за масою); індичат – 3–5; каченят – 2–3, гусенят – до 3–5 %; для племінного молодняку: курчатам – до 2–3 %; каченят – 1–3; гусенят – 1–5; для курей-несучок – 3–5; качок – 2 і гусям – 1–2 %

Надлишкова енергетична годівля спричинює ожиріння, цукровий діабет, серцево-судинні та інші захворювання, а недостатня призводить до низького засвоєння поживних речовин корму, розвитку аліментарної дистрофії, кетозу та інших хвороб. Нестача в раціоні жиру спричинює розлад репродуктивної функції, погіршене засвоєння жиророзчинних вітамінів, ураження шкірного покриву (дефіцит ліноленової кислоти), зниження запліднюваності яєць та природної резистентності організму.

Причинами порушення обміну ліпідів на стадіях травлення, всмоктування і проміжного обміну часто є різні захворювання шлунка (сичуга), передшлунків, кишечника, підшлункової залози, печінки та ендокринних органів.

Процес обміну ліпідів досить складний. Джерелами їх в організмі є тваринні жири, корми рослинного та тваринного походження. У свиней основним джерелом ліпідів є вуглеводи корму. У жуйних одним із компонентів утворення жиру, у тому числі молочного, є ацетат, тому при зменшенні утворення оцтової кислоти в рубці жирність молока знижується.

Перетравлювання жирів корму здійснюють ліпази, що містяться у шлунковому, підшлунковому та кишковому соках. У шлунку (сичузі)

розщеплюються лише жири молока, які містяться у вигляді тоненької емульсії, але це розщеплення неповне, оскільки кисла реакція в шлунку руйнує жирову емульсію молока.

Основний гідроліз жирів здійснюється у тонкому кишечнику за участі панкреатичних ферментів: ліпази, холінестерази, фосфоліпази та ін. Панкреатична ліпаза гідролізує жир на гліцерол і вільні жирні кислоти (ВЖК). При ураженнях підшлункової залози (гострий і хронічний панкреатит, злоякісні пухлини, кіста чи атрофія підшлункової залози) знижується її екскреторна функція та активність ферментів, у тому числі ліпази, внаслідок чого жири не перетравлюються повністю і виводяться з калом (стеаторея). Зниження активності панкреатичної ліпази виявлено у телят, хворих на бронхопневмонію та диспепсію.

При зовнішньосекреторній недостатності підшлункової залози калові маси рідкі, пінисті, сірого або глиняно-жовтого кольору, жирного вигляду, із кислим запахом. Мікроскопією в калі виявляють рештки нейтрального жиру. Реакція калу за недостатнього надходження в кишечник жовчі є кислою.

Однією з умов нормального гідролізу жирів ліпазою є їх емульгування жовчю і жовчними кислотами. У здорових тварин секреція жовчі корелює з кількістю жиру в раціоні. У телят віком 3–6 місяців протягом доби виділяється 4–9 л жовчі, а в корів з масою тіла 550 кг – від 21–24 до 30 л. Найбільш специфічним складовим елементом жовчі є жовчні кислоти (ЖК, холати), яких у телят протягом доби у просвіт кишечника виділяється 30–50 г. Жовчні кислоти знижують поверхневий натяг жирових крапель і диспергують їх: великі краплі жиру розпадаються на дрібні, розміри яких не перевищують 0,5 мкм. У такий спосіб поверхня контакту жиру з ліпазою значно збільшується. Окрім того, ЖК активують ліпазу, утворюють розчинні у воді комплекси з жирними кислотами (холейнові кислоти), які легко всмоктуються. Уже в клітинах кишкового епітелію холейнові кислоти розпадаються на жирні і жовчні кислоти. Останні надходять у ворітну вену і в печінці знову входять до складу жовчі. За деякими даними, нейтральні жири можуть частково всмоктуватися в кров і лімфу у вигляді тонкої емульсії, яка утворюється за наявності ЖК.

При патології печінки (гепатит, гепатодистрофія, цироз, холецистит, пухлини) секреція жовчі та холатів знижується: у молодняку при експериментально спричиненому гепатиті секреція жовчі та холатів – удвічі; при абсцесах печінки та гепатодистрофії вміст ЖК у жовчі зменшений у 1,3–1,5, у тому числі глікокон'югатів – у 2–2,3 рази. За недостатньої секреції жовчі та холатів гідроліз і всмоктування жирів у кишечнику суттєво зменшується, а їх кількість у калі різко зростає (стеаторея). Стеаторея супроводжується діареєю, при якій організм втрачає поживні речовини, електроліти та воду

Під жировим обміном мається на увазі сукупність процесів, пов'язаних з всмоктуванням, переварюванням нейтральних жирів, продуктів розпаду ліпідом в шлунково-кишковому тракті. Відповідає він за проміжні результати обміну жирних кислот, жирів, їх виведення з організму. Холестерин переносять молекули ліпопротеїни. Їх типи:

- хиломікрони;
- ліпопротеїни дуже низького ступеня щільності (ЛПДНЩ);
- низької щільності (ЛПНЩ);
- високої щільності;
- проміжної щільності (ЛППП);
- простий ліпопротеїн (а).

Зміст тригліцеридів, холестерину, фосфоліпідів в частинках різне. ЛПНЩ – головні переносники холестерину всередині клітин. З ростом кількість елемента пов'язаний розвиток атеросклеротичних судинних уражень. Ліпопротеїни високої ступені щільності сприяють виведенню холестерину в печінку для подальшої утилізації. Головний спосіб діагностики – аналіз крові на загальний холестерин. Кількісне визначення білків допомагає уточнювати діагнози, оцінювати ризики виникнення патологічних змін судин серця. Значення молекулярно-біологічних методик оцінки ліпідного статусу в останні роки помітно зросла.

Порушення ліпідного обміну зазвичай стає наслідком нестачі панкреатичної ліпази, зниження виділення жовчі, порушення функцій кишкового епітелію.

Контрольні запитання

1. Білок і його фізико-хімічні властивості.
2. Біологічна роль білка.
3. Потреба організму в білках. Азотистий баланс.
4. Білковий обмін та його порушення.
5. Вуглеводний обмін в організмі.
6. Порушення обміну вуглеводів.
7. Методи діагностики порушення обміну вуглеводів.
8. Біологічна роль ліпідів, їх перетравлювання та всмоктування.
9. Порушення обміну ліпідів.

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

Анотація. У розділі розкрито хімічна природа ферментів, відмінність ферментів від неорганічних каталізаторів, механізм ферментативних реакцій, типи ферментативних реакцій, мультиферментні комплекси, їх структура та функції, регуляція активності ферментів.

Хімічна природа ферментів

Ферменти є біокаталізаторами білкової природи. Каталізуючи переважну більшість біохімічних реакцій в організмі, ферменти регулюють обмін речовин і енергії, відіграючи тим самим важливу роль в усіх процесах життєдіяльності. Усі функціональні прояви живих організмів (дихання, м'язове скорочення, передача нервового імпульсу, розмноження і т. д.) забезпечуються дією ферментних систем. Ферменти – це функціональні одиниці клітинного метаболізму.

Таким чином, ферменти – специфічні речовини білкової природи, наявні у тканинах і клітинах усіх живих організмів і здатні в багато разів прискорювати хімічні реакції, що відбуваються в них. Тобто, за хімічною природою ферменти – це білки, виняток – рибозими (пре-іРНК). Ферментам властиві усі особливості структурної організації білків. Вони мають чотири рівні організації: первинний, вторинний, третинний і четвертинний. Ферменти з четвертинною структурою, а їх більшість, складаються з протомерів (субодиниць). Ферментам притаманні фізико-хімічні властивості білків, а саме:

1. Висока молекулярна маса.
2. Розщеплення до амінокислот під час гідролізу.
3. Амфотерність.
4. Утворення колоїдоподібних розчинів.
5. Вони не стійкі до впливу високих температур та солей важких металів.
6. Проявляють антигенні властивості.
7. Піддаються фракціонуванню та ін.

Головним доказом білкової природи ферменту є втрата активності при дії протеолітичних ферментів. При дії пепсину або трипсину на будь-який фермент він втрачає свою каталітичну активність.

Відмінність ферментів від неорганічних каталізаторів

Ферменти мають специфічні властивості, які відрізняють їх від інших каталізаторів. Ці відмінності пов'язані з особливостями будови ферментів. До

особливостей ферментативного каталізу відносяться:

1. *Висока ефективність*. Швидкість ферментативного каталізу набагато вища, ніж небіологічного. Ферменти здатні знижувати енергію активації біохімічних процесів у 2–3 рази більше порівняно з можливістю зниження ЕА неорганічними каталізаторами, тому ферменти діють у 10^3 – 10^6 разів швидше, ніж небіологічні каталізатори. Ферменти підвищують швидкість реакцій, що каталізуються ними, у 10^8 – 10^{20} разів. Наприклад, уреаза прискорює гідроліз сечовини у 10^{14} разів. Одна молекула ферменту за 1 хв може каталізувати до мільйона молекул речовини. Ця швидкість каталізу недосяжна для небіологічних каталізаторів. Така ефективність пояснюється, по-перше, концентраційним фактором – активною сорбцією ферментом субстрату, що еквівалентно збільшенню його концентрації. Концентраційний фактор збільшує швидкість у тисячі разів. По-друге, ферменти проявляють орієнтаційний ефект, що також збільшує швидкість.

Фермент здатний зв'язувати молекулу субстрату таким чином, що хімічний зв'язок, на який діє фермент, розташовується не тільки безпосередньо близько від каталітичної групи, але й правильно орієнтованим відносно неї. Це різко збільшує ймовірність ефективного зіткнення. Упорядковане розміщення субстратів призводить до зниження ентропії і, відповідно, сприяє зменшенню енергії активації. І по-третє, ферменти мають поліфункціональний ефект – на молекулу субстрату одночасно діють кілька атакуючих груп ферменту.

2. *Специфічність*. Заснована на комплементарності структури субстрату і активного центру ферменту. За мірою специфічності ферменти поділяють на такі основні види.

А. *Стереохімічна субстратна специфічність*. Фермент каталізує перетворення тільки одного з можливих стереоізомерів субстрату. За наявності в субстрату декількох стереоізомерів фермент проявляє абсолютну специфічність до одного з них. В організмі людини спостерігається специфічність до таких стереоізомерів:

Стереоспецифічність до D-моносахаридів. Більшість моносахаридів і продуктів їх обміну в організмі людини відносять до D-стереоізомерів. Ферменти, що забезпечують їх метаболізм, мають специфічність до D-, а не до L-моносахаридів.

Каталітична специфічність. Фермент каталізує перетворення приєданого субстрату за одним з можливих шляхів його перетворення. Ця властивість забезпечується будовою каталітичної ділянки активного центру ферменту і називається каталітичною специфічністю, або специфічністю шляху перетворення субстрату.

Механізм ферментативних реакцій

За всю історію ензимології було запропоновано багато гіпотез, що пояснювали механізм дії ферментів. Більшість із них має суто історичний характер і не витримала випробувань у світлі нових даних про структуру ферментів та їх активного й алостеричного центрів. Заслуговує уваги гіпотеза, що запропонована на початку ХХ ст. О. Варбургом і У. Бейлісом. Її значення полягає в тому, що вона пов'язувала механізм дії ферментів із дією неорганічних каталізаторів. Ця гіпотеза пояснювала, що поверхня ферменту служить місцем для адсорбції реагентів. За цих умов різко зростає кількість молекул субстрату, що припадає на одиницю площі ферменту, а отже, за законом діючих мас зростає і швидкість реакції.

Також припускалось, що в результаті зв'язування субстрату з активним центром ферменту відбуваються механічні зміни молекул субстрату, що призводить до більшої реакційної здатності. Але адсорбційна гіпотеза не могла пояснити специфічності дії ферментів.

Для пояснення специфічності дії ферментів у 1894 р. Е. Фішер запропонував гіпотезу, яку ще й досі називають гіпотезою «ключа і замка» або гіпотезою «шаблону». В основі специфічності, за цією гіпотезою, лежить жорстка просторова відповідність субстрату і активного центру ферменту. За Е. Фішером реакція можлива тільки в тому випадку, якщо просторово субстрат підходить до ферменту як ключ до замка. Якщо субстрат (ключ) просторово відрізняється від структури активного центру ферменту (замок), то реакція не відбувається.

Але і ця гіпотеза (гіпотеза відповідності) не може пояснити різні види специфічності, бо важко уявити собі ситуацію, коли декілька ключів (субстратів) підходять до одного замка (ферменту). Тому ця гіпотеза у 1958 р. була замінена і доповнена гіпотезою вимушеної співвідповідності (гіпотеза індукованої адаптації ферменту до субстрату, «рука-рукавичка») Д. Кошленда. Згідно з цією гіпотезою конфігурація ферменту і його активного центру є гнучкою й еластичною, що змінюється під впливом субстрату, тобто субстрат індукує у ферменті зміни конфігурації молекул відповідно до власної структури. Але приєднання субстрату до ферменту може спричинити зміни активного центру, при яких він утворює із субстратом неактивний комплекс, і тоді реакція не відбувається.

Механізми каталізу

1. Кислотно-основний каталіз. В активному центрі ферменту знаходяться групи специфічних амінокислотних залишків, які є донорами або акцепторами протонів. Такі групи є потужними каталізаторами багатьох біохімічних реакцій.

2. Ковалентний каталіз. Ферменти реагують зі своїми субстратами,

утворюючи за допомогою ковалентних зв'язків нестабільні фермент-субстратні комплекси, з яких у ході внутрішньомолекулярних перебудов утворюються продукти реакції.

Згідно з гіпотезою Міхаеліса–Ментен ферментативна реакція завжди супроводжується утворенням проміжної коротко існуючої сполуки – фермент-субстратного комплексу. Процес утворення комплексу описується рівнянням і має декілька стадій перебігу, кожній з яких притаманні свої особливості.

Достовірність утворення фермент-субстратного комплексу, постульованого вперше Л. Міхаелісом, зараз доведена експериментально, математично та методами ЕПР і ЯМР (електронного парамагнітного резонансу і ядерного магнітного резонансу). Перші докази існування фермент-субстратного комплексу були одержані в лабораторії Д. Кейліна. Сучасні методи дослідження дозволяють визначити для ряду ферментативних реакцій константи швидкості утворення фермент-субстратних комплексів та їх дисоціації на фермент і продукти.

Встановлено, що в утворенні фермент-субстратних комплексів беруть участь водневі зв'язки, електростатичні та гідروفобні взаємодії. Досліджуючи рівняння Міхаеліса–Ментен, можна також вивчити кінетику ферментативних реакцій, встановити порядок реакції та стежити за впливом різних чинників на перебіг ферментативного процесу. Загалом прискорення хімічних реакцій відбувається завдяки тому, що ферменти забезпечують правильну орієнтацію молекули субстрату біля каталітичного центру, надають для каталізу протон-донорні та протон-акцепторні групи, утворюють за допомогою ковалентних зв'язків нестабільні проміжні сполуки із субстратом і викликають напруження в молекулі субстрату або її деформацію.

Типи ферментативних реакцій

1. «Пінг-понг». Фермент спочатку взаємодіє із субстратом А, відбираючи у нього окремі хімічні групи і перетворюючи його на відповідний продукт. Потім до ферменту приєднується субстрат В, який одержує ці хімічні групи. Прикладом є реакції перенесення аміногруп від амінокислот на кетокислоти.

2. «Послідовних реакцій». До ферменту послідовно приєднуються субстрати А і В, утворюючи «потрійний комплекс», після чого здійснюється каталіз. Продукти реакції також послідовно відщеплюються від ферменту.

3. «Випадкових взаємодій». Субстрати А і В приєднуються до ферменту в будь-якому порядку, нерегульовано, і після каталізу так само відщеплюються.

Ферменти, що каталізують одну і ту ж хімічну реакцію, але відрізняються за первинною структурою, називають ізoferментами, або ізoензимами. Вони каталізують один і той же тип реакції з принципово однаковим механізмом, але

відрізняються один від одного кінетичними параметрами, умовами активації, особливостями зв'язку апоферменту і коферменту.

Природа появи ізоферментів різноманітна, але найчастіше обумовлена відмінностями у структурі генів, що кодують ці ізоферменти. Отже, ізоферменти розрізняються за первинною структурою білкової молекули і, відповідно, за фізико-хімічними властивостями. На відмінностях у фізико-хімічних властивостях засновані методи визначення ізоферментів.

За своєю структурою ізоферменти в основному є олігомерними білками. Причому та або інша тканина переважно синтезує певні види протомерів. У результаті певної комбінації цих протомерів формуються ферменти з різною структурою – ізомерні форми. Виявлення певних ізоферментних форм ферментів дозволяє використовувати їх для діагностики захворювань (ЛДГ, КК, АСТ та ін.).

Мультиферментні комплекси, їх структура та функції

Однією з принципових відмінностей ферментів від каталізаторів небіологічного походження є кооперативний характер їх дії. На рівні поодинокі молекули ферменту кооперативний принцип реалізується в тонкій взаємодії субстратного, активного і алостеричного центрів.

Проте набагато більше значення має кооперативне здійснення реакцій на рівні ансамблів ферментів. Саме завдяки наявності систем ферментів – у вигляді мультиферментних комплексів ще складніших утворень – метаболонів, що забезпечують каталітичні перетворення усіх учасників єдиного метаболічного циклу – в клітинах з великою швидкістю здійснюються багатостадійні процеси як розпаду, так і синтезу органічних молекул. Ферментативний каталіз в багатостадійних реакціях йде без виділення проміжних продуктів: тільки виникнувши, вони тут же піддаються подальшим перетворенням.

Це можливо лише тому, що у клітині ферменти розподілені не хаотично, а строго впорядковано. З сучасної точки зору клітина являє собою високоорганізовану систему, в окремих частинах якої здійснюються строго визначені біохімічні процеси. Відповідно до належності їх до певних субклітинних часток або відсіків (компаратментів) клітини, в них локалізовані індивідуальні ферменти, мультиферментні комплекси, поліфункціональні ферменти або складні метаболони.

Різнманітні гідролази і ліази зосереджені переважно в лізосомах. Усередині цих порівняно невеликих (декілька нанометрів у діаметрі) бульбашок, обмежених мембраною від гіалоплазми клітини, відбуваються процеси деструкції різних органічних сполук до тих простих структурних одиниць, з яких вони побудовані.

Складні ансамблі окисно-відновних ферментів, такі, наприклад, як

цитохромна система, знаходяться в мітохондріях. У цих же субклітинних частках локалізований набір ферментів циклу трикарбонових кислот.

Ферменти активування амінокислот знаходяться у гіалоплазмі, але вони є і в ядрі. У гіалоплазмі наявні численні метаболони гліколізу, структурно об'єднані з шляхами пентозофосфатного циклу, що забезпечує взаємопереключення дихотомічного і апотомічного шляхів розпаду вуглеводів. У той же час ферменти, які прискорюють перенесення амінокислотних залишків на зростаючий кінець поліпептидного ланцюга і каталізуючі деякі інші реакції у процесі біосинтезу білку, зосереджені у рибосомальному апараті клітини.

Нуклеотидилтрансферази, прискорювальні реакції перенесення нуклеотидних залишків при синтезі нуклеїнових кислот, локалізовані в основному в ядерному апараті клітини.

Таким чином, системи ферментів, зосереджені в тих або інших структурах, беруть участь у здійсненні окремих циклів реакцій. Будучи тонко координовані один з одним, ці окремі цикли реакцій забезпечують життєдіяльність клітин, органів, тканин і організму в цілому. У мультиферментних системах субстрат і проміжні сполуки від початку до кінця метаболічного циклу не залишають комплекс.

Регуляція активності ферментів

Активність ферментів у клітині непостійна в часі. Вона чутливо реагує на ситуацію, в якій опиняється клітина, на чинники, що впливають на клітину як ззовні, так і зсередини.

Головна мета цієї реакції – відреагувати на зміну довкілля, пристосувати клітину до нових умов, дати належну відповідь на гормональні та інші стимули, а в деяких ситуаціях – отримати шанс вижити.

1. Компартаментація – це зосередження ферментів та їх субстратів в одному компартменті (одній органелі)

2. Доступність субстрату або коферменту. Тут працює закон дії мас – фундаментальний закон хімічної кінетики: при постійній температурі швидкість хімічної реакції пропорційна множенню концентрацій реагуючих речовин. Чи спрощено – швидкість, з якою речовини реагують одна з одною, залежить від їх концентрації.

Таким чином, зміна кількості хоча б одного з субстратів припиняє або розпочинає реакцію. Для циклу трикарбонових кислот таким субстратом є оксалоацетат.

3. Зміна кількості ферменту. Може відбуватися в результаті збільшення або зниження його синтезу. Зміна швидкості синтезу ферменту зазвичай залежить від кількості певних гормонів або субстратів реакції. Наприклад, гормон

кортизол стимулює синтез ферментів глюконеогенезу, що забезпечує стабільність концентрації глюкози в крові та стійкість ЦНС до стресу. Під час вагітності та після пологів під впливом лактотропного гормону в молочній залозі активно йде синтез ферменту лактозосинтази. Зникнення травних ферментів при тривалому голодуванні та їх поява у відновний період у результаті зміни секреції кишкових гормонів. Етанол стимулює в печінці синтез «свого» (що знешкоджує етиловий спирт) ізоферменту цитохрому Р-450.

4. Обмежений (частковий) протеоліз проферментів. Деякі ферменти, що функціонують поза клітинами (у шлунково-кишковому тракті або плазмі крові), синтезуються у вигляді неактивних попередників і активуються тільки в результаті гідролізу одного або декількох певних пептидних зв'язків, що призводить до відщеплення частини білкової молекули попередника.

У результаті залишку білкової молекули відбувається конформаційна перебудова і формується активний центр (трипсиноген–трипсин, пепсиноген–пепсин, прокарбоксипептидаза – карбоксипептидаза, інсулін, чинники згортання крові).

Контрольні запитання

1. Яка хімічна природа ферментів.
2. Відмінність ферментів від неорганічних каталізаторів.
3. Який механізм ферментативних реакцій.
4. Назвіть типи ферментативних реакцій
5. Мультиферментні комплекси, їх структура та функції.
6. Регуляція активності ферментів.
7. Поясніть, які завдання у ензимодіагностики.

ТЕМА 3. ІЗОФЕРМЕНТИ ТА ЇХ РОЛЬ У ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ

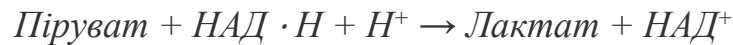
Анотація. У розділі розкрито поняття про ізоферменти, наведено відомості про ізоферменти лужної фосфатази, креатинкінази, холінестерази, глутаматдегідрогенази.

Ізоферменти (ізозими) (лат. *Isopermenta* < грец. *isos* – однаковий + лат. *fermentum* (грец. *зуме* – закваска)) – множинні молекулярні форми одного й того самого ферменту, які характеризуються генетично зумовленими

відмінностями первинної структури, набором і співвідношенням субодиниць та різною каталітичною активністю.

Ізоферменти каталізують одну й ту саму біохімічну реакцію. Ізоформи характерні для більшості ферментів рідин і тканин організму. Ізоферментні форми відрізняються за властивостями (оптимальним рН, спорідненістю до субстрату, кофакторів, інгібіторів та активаторів, амінокислотним складом, імунобіологічними характеристиками, електрофоретичною рухомістю).

Якщо фермент, представлений ізоферментними формами, має олігомерну будову, його ізоферменти формуються за рахунок різних комбінацій неідентичних протомерів. Прикладом можуть бути ізоферменти лактатдегідрогенази (ЛДГ; лактат НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27) – ферменту, що каталізує зворотну реакцію перетворення піровиноградної кислоти на молочну:



За своєю молекулярною структурою ЛДГ є тетрамером, що складається з протомерів двох типів: Н (англ. *heart* – серцевий) та М (англ. *muscle* – м'язовий). В організмі людини присутні 5 комбінацій зазначених протомерів, які створюють різні ізоферменти ЛДГ: НННН (ЛДГ₁), НННМ (ЛДГ₂), ННММ (ЛДГ₃), НМММ (ЛДГ₄) та ММММ (ЛДГ₅).

Для кожного органа характерні певні ізоферменти ЛДГ. В серцевому м'язі переважає ЛДГН₄; в еритроцитах, мозку, нирках присутні ЛДГН₄ і ЛДГН₃М; ЛДГМ₄ переважає у м'язах. У тканинах печінки, легень присутня також ізоформа, яка містить три М- та одну Н-субодиницю (ЛДГМ₃Н). У тканині селезінки і деяких ендокринних залоз переважає ЛДГН₂М₂.

Відмінності у співвідношенні субодиниць ізоферментних форм визначають відмінності їх кінетичних та фізико-хімічних властивостей (ці ізоферменти розрізняються за своєю електрофоретичною рухомістю). Залежно від віку, фізіологічного стану організму встановлюється певне співвідношення різних форм ферменту.

Визначення ізоферментів ЛДГ в сироватці крові хворих має діагностичне значення для виявлення пошкоджень мембранних структур, що виявляють при різних захворюваннях (інфаркті міокарда, гепатиті тощо).

На сьогодні вже виділено ізоформи лужної фосфатази, креатинкінази, малатдегідрогенази, фосфоглюкомутази, піруваткінази, ізоцитратдегідрогенази, аргінінсукцинатсинтетази та ін.

Ізоферменти лужної фосфатази.

Лужна фосфатаза в крові присутня у вигляді кількох ізоформ: кишкова – виробляється клітинами слизової оболонки кишечника, частково всмоктується у

кров; печінкова – представлена двома видами: перша підвищується в крові при застійних процесах у жовчному міхурі, друга – при руйнуванні клітин печінки.

Лужна фосфатаза (ЛФ) бере участь у відщепленні залишку фосфорної кислоти від її органічних ефірних сполук. Фермент розміщується в клітинах у зв'язаному з плазматичними мембранами стані, тому разом із ГГТ, ЛАП, 5-нуклеотидазою належить до мембранозв'язних. ЛФ складається із різних ізоферментів, які локалізуються переважно в епітелії жовчовидільних шляхів, плазматичних мембранах гепатоцитів і нейронів, кістках, кишечнику, плаценті, нирках. Визначення активності різних фракцій можливе шляхом електрофорезу досліджуваного субстрату. Проте, ізоферменти ЛФ не мають чіткої органної специфічності, а електрофоретична методика є складною. Тому для спрощення досліджень використовують методику, яка ґрунтується на різній чутливості ізоферментів до тепла. Кишкова ЛФ складає термостабільну фракцію, а ізоферменти із печінки та кісткової тканини — термолабільну. Найбільш чутлива до нагрівання кісткова фосфатаза.

Надходження ферменту з різних тканин у кров залежить від віку та фізіологічного стану (тільність, роди, інтенсивність лактації). Висока активність ЛФ у крові молодняку пояснюється інтенсивним функціонуванням остеобластів у кістковій тканині, що зумовлене процесами активного росту організму. У цей період активності ферменту в крові зростає за рахунок кісткового ізоферменту. У другій половині вагітності та під час родів активне зростання та руйнування плаценти спричиняють збільшення активності плацентарного ізоферменту.

Підвищення активності ЛФ у сироватці крові найчастіше реєструється при патології печінки та кісткової тканини. Ураження паренхіми печінки викликає незначне зростання активності ферменту в сироватці крові, оскільки ЛФ міцно зв'язана з клітинними мембранами. У клінічній гепатології печінковий ізофермент є показовим для діагностики холестазу. Це пов'язано з підвищеним синтезом ЛФ клітинами жовчних протоків і порушенням виділення ензиму в жовч. Особливо високою є гіперферментемія при розвитку патологічного процесу та стазу жовчі в позапечінкових жовчних протоках. Тоді активність ензиму в сироватці крові зростає в десятки разів. При пошкодженні внутрішньопечінкових жовчних шляхів та інтрагепатитному холестази активність ЛФ у крові збільшується лише у 2–3 рази.

При патології кісткової тканини, коли має місце підвищена діяльність остеобластів, під час розвитку рахіту, остеодистрофії, гіперпаратиреоїдизмі у крові зростає активність кісткового ізоферменту ЛФ. У цих випадках активність загальної ЛФ у сироватці крові збільшується у 3-10 разів. Для ранньої діагностики рахіту та остеодистрофії специфічним є зростання активності

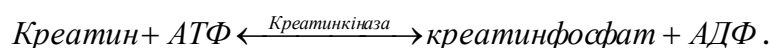
фосфатази у синовіальній рідині. Збільшення активності ЛФ у лікворі є ознакою ураження мембран нейронів, де вона локалізується.

Активність ЛФ у сироватці крові тварин, од/л

ВРХ		Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
дорослі	телята						
100–200	100–300	100–250	40–150	50–100	100–340	30–110	40–140

Ізоферменти креатинкінази

Креатинкіназа – фермент із групи фосфотрансфераз, що каталізує реакцію зворотного переносу залишку фосфорної кислоти з АТФ на креатин із утворенням креатинфосфату.



Креатинкіназа (КК) каталізує зворотну реакцію фосфорилювання креатину. КК розміщується в м'язах скелету (90 %) та серця (2 %) і мозковій тканині (8 %). Фермент є високоспецифічним тестом пошкодження м'язових волокон скелету та серця, при його дослідженні у крові (сироватка, плазма), а також мозку — при визначенні у спинномозковій рідині (лікворі). Значна гіперферментімія (500–5500 од/л) спостерігається у хворих на м'язову дистрофію, при міозиті, ішемії, травматичному пошкодженні та метаболічному порушенні в м'язах, залежанні, фізичному навантаженні. При ураженні серцевого м'яза (інфаркт, міокардит, міокардіодистрофія, серцева недостатність) активність КК у сироватці крові зростає до 10 і більше разів. При виникненні інфаркту міокарда активність ензиму зростає через декілька годин і є високою протягом тижня.

Захворювання, які перебігають з ураженням головного та спинного мозку (крововилив, менінгоенцифаліт, менінгіт, енцефаліт, мієліт, некроз та ін.), спричиняють зростання КК у лікворі хворих органів. Локалізуючись у цитоплазмі нейронів, фермент елімінується у спинномозкову рідину навіть при незначному пошкодженні і зростає при деструкції клітин мозку. Наприклад, при печінковій енцефалопатії активність КК у лікворі збільшується удвічі, а при печінковій комі – у 14 разів. Підвищене значення активності ферменту виявляють у здорових тварин після значного фізичного навантаження, спортивних змагань, проведення хірургічних втручань.

Активність КК у сироватці крові тварин, од/л

ВРХ	Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
-----	------	-------	-------	------	--------	------

20–100	20–130	100–2000	10–25	20–65	10–90	30–130
--------	--------	----------	-------	-------	-------	--------

Ізоферменти холінестерази

Холінестераза сироватки крові розщеплює ефіри холіна (ацетилхолін, бутирилхолін) на холін і відповідну кислоту. Фермент синтезується у гепатоцитах печінки, тому ступінь активності холінестерази залежить від стану цього органу.

Зменшення активності холінестерази спостерігається при гострому гепатиті, гепатозі, отруєннях фосфорорганічними отрутохімікатами.

Активність холінестерази у сироватці крові тварин, од/л

ВРХ	Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
50–100	1500–3000	200–550	20–50	15–44	1500–4000	1000–3000

Ізоферменти глутаматдегідрогенази

Глутаматдегідрогеназа перетворює альфа-кетоглутарову кислоту у глутамінову. ГЛДГ локалізована в основному в мітохондріях клітин печінки. Активність ферменту в сироватці крові є незначною. Зростання активності ГЛДГ у крові тварин свідчить про порушення структури і лізис мітохондрій гепатоцитів.

Ензим є досить чутливим тестом діагностики жирової дистрофії печінки у корів. Вже при слабкому ступені жирового гепатозу активність ГЛДГ у сироватці крові зростає у 5 разів, при середньому — у 5–10, при важкому — у 10–20. Можливо, це пов'язано з тим, що мітохондрії беруть основну участь у метаболізмі вільних жирних кислот і швидко уражуються при функціональному перевантаженні та переповненні ліпідами (Влізло В. В., 1998).

У зоні, яка прилягає до центральної вени печінової частки, під дією різних гідростатичних коливань чи гострої аноксії (гідростатичний та гіпоксичний цитоліз) настає швидке ураження мітохондрій гепатоцитів і активність ГЛДГ зростає. Гіперферментемія може спостерігатися також при гострому закупоренні загального жовчного протоку, коли виникає жовчна гіпертензія. Активність ГЛДГ в інших органах (нирки, підшлункова залоза, серце, мозок, кишечник) є дуже малою. Тому визначення активності глутаматдегідрогенази має специфічне значення лише при діагностиці захворювань печінки.

Активність ГЛДГ у сироватці крові тварин, од/л

ВРХ	Коні	Свині	Вівці	Кози	Собаки	Коти
1–8	2–8	1–6	1–6	1–10	1–6	1–6

Контрольні запитання

1. Надайте поняття про ізоферменти.
2. Ізоферменти лужної фосфатази.
3. Ізоферменти креатинкінази.
4. Ізоферменти холінестерази.
5. Ізоферменти глутаматдегідрогенази.

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

Анотація: У розділі розглянуто функції жовчі, найбільш важливі компоненти жовчі, зміни фізичних властивостей і хімічного складу жовчі при хворобах печінки, поділ жовчних конкрементів за хімічним складом, значення функціональних проб для діагностики захворювань печінки, синдром запалення, синдром цитолізу, гепатодепресивний синдром, синдром холестазу, синдром мінерально-вітамінної недостатності, гепатоцеребральний синдром, гепаторенальний синдром

Зміни фізичних властивостей і хімічного складу жовчі при хворобах печінки

Найбільш специфічним продуктом діяльності гепатоцитів є жовч, зокрема жовчні кислоти. Тому за їхнім складом можна з високою вірогідністю діагностувати функціональний стан гепатоцитів. Класичні дослідження з вивчення жовчоутворення і жовчовиділення та значення жовчі для організму були проведені І.П. Павловим та його учнями. В Україні ці питання вивчали С.Ю. Ярослав, А.С. Дячинський, В.С. Козачок, Р.С. Ледяйкіна, П.С. Лященко, Б.В. Олійник та інші фізіологи і патологи.

Жовч виконує такі функції:

- а) емульгує ліпіди, внаслідок чого створюються оптимальні умови для дії ліпази підшлункової залози;
- б) активує ліпазу, сприяє гідролізу і всмоктуванню продуктів перетравлення жирів;

- в) бере участь у нейтралізації кислот, які надходять із шлунка у дванадцятипалу кишку;
 - г) активує кишкові і панкреатичні протеолітичні ферменти, стимулює виділення соку підшлункової залози;
 - д) поліпшує всмоктування жиророзчинних вітамінів (А, Д, Е, К), холестеролу, амінокислот;
 - е) активує перистальтику кишок;
 - ж) є одним із найважливіших фізіологічних стимуляторів жовчоутворювальної функції печінки;
- з) із жовчю виділяються білірубін, холестерол, лікарські препарати, отрути, тому жовч є не лише секретом, а й екскретом.

Найбільш важливим компонентом жовчі є жовчні кислоти (ЖК, холати), які за хімічною структурою є стероїдними монокарбонними кислотами – похідними холанової кислоти, від якої вони відрізняються наявністю однієї, двох або трьох гідроксильних груп, у зв'язку з чим розрізняють моно-, ди- і тригідроксихоланові кислоти.

У жовчі всіх ссавців ЖК перебувають у вигляді парних сполук з амінокислотами – таурином і глікоколом (кон'юговані ЖК).

Синтез холатів проходить лише в печінці. Безпосереднім попередником їх є холестерол. Трансформація холестеролу в первинні ЖК (хولة – ХК і хенодесоксихولة – ХДХ) – це складний багатоступеневий процес, що відбувається в гепатоцитах при значних затратах енергії. Біосинтез холатів регулюється за типом зворотного зв'язку самими холатами, які повертаються у печінку в процесі ентерогепатичної циркуляції. Сприяють синтезу ЖК холіноміметики – ацетилхолін і карбахолін. У гепатоцитах ЖК кон'югуються з глікоколом або таурином, і у формі гліко- або таурокон'югатів вони включаються в міцелу, до складу якої, окрім них, входять основні компоненти жовчі – фосфоліпиди, холестерол, білірубін і невелика кількість білків.

У дистальній частині клубової кишки солі ЖК реабсорбуються. Цей процес настільки інтенсивний, що за один цикл печінково-кишкової циркуляції реабсорбується близько 95 % ЖК. У товстих кишках кон'югати жовчних кислот під впливом ферментів мікроорганізмів розпадаються. При цьому утворюються вільні ЖК, які частково всмоктуються і через портальну вену потрапляють у печінку. Переважна ж кількість їх під впливом мікрофлори перетворюється в різні кетопохідні холанової кислоти і виділяється з калом.

Порушення синтезу і кон'югації ЖК та секреції жовчі в людей має місце при цукровому діабеті, холангіогепатиті, гострому портальному і біліарному цирозах, холециститі. У хворих людей уміст ЖК у жовчі зменшується, а

концентрація холестеролу збільшується. Це спричинює зменшення холато-холестеролового коефіцієнта (ХХК), що є важливим критерієм для прогнозування і діагностики жовчнокам'яної хвороби (холелітіазу). Найбільш значні порушення співвідношення між холатами і холестеролом спостерігаються при гострому гепатиті, гострому і хронічному холециститі, цирозі печінки. Зниження ХХК у жовчі залежить в основному від синтетичної функції печінки, тобто є показником функціональної недостатності гепатоцитів. У хворих людей порушується динамічна рівновага між гліко- і таурокон'югатами, ди- і триглідроксихолатами. Зниження останнього співвідношення є показником холестазу.

Патофізіологія жовчовиділення у сільськогосподарських тварин вивчена значно менше, оскільки ця робота вимагає проведення експериментальних досліджень на тваринах із фістулою жовчного міхура і кишечника. У свиней, хворих на гастроентерит, у перші 2–3 дні хвороби спостерігається пригнічення жовчовиділення, потім збільшується секреція жовчі, після чого знову зменшується жовчовиділення. Концентрація холатів у жовчі при цьому знижується. У свиней при експериментальній токсичній гепатодистрофії також зменшується секреція жовчі і синтез ЖК.

У молодняку великої рогатої худоби секреція жовчі проходить безперервно, але не ритмічно. Щогодини виділяється від 100 до 750 мл жовчі (у середньому – 310 мл), а протягом доби – 4,0–8,5 л. Втрата жовчі через фістулу уже через 3 години призводить до зменшення її секреції у 2 рази, а через 5 годин – більше ніж у 7 разів. Колір жовчі звичайно – від світло- до темно-зеленого, інколи – жовтий, консистенція – сироподібна, відносна густина печінкової жовчі – 1,007–1,009, а міхурової – 1,014–1,022; величина рН – 7,5–9,0.

Із пігментів у жовчі переважає білівердин, який на світлі швидко окиснюється в білірубін. Уміст білірубіну протягом доби коливається в широких межах – від 2 до 50 мг/100 мл (34,2–855 мкмоль/л) і становить у середньому близько 200 мкмоль/л. Уміст кон'югованого білірубіну знаходиться в межах від 85 до 171 мкмоль/л (у середньому – 145–150). Частка його від загального становить близько 75 %.

Іншим постійним компонентом жовчі є вільний холестерол. У печінковій жовчі уміст його становить 1,3–8,8, у міхуровій – 7,0–15,0 ммоль/л. Холестерол входить до складу жовчних міцел, у яких він стабілізується фосфоліпідами і холатами і тому є розчинним. Холато-холестероловий коефіцієнт міхурової жовчі становить у середньому 6,6.

Концентрація холатів у печінковій жовчі становить 8,0–58,0, а в міхуровій – 50,0–115,0 ммоль/л. Протягом доби в кишечник виділяється від 30 до 50 г холатів, проте лише 5–8 % їх виділяється з калом, а решта – реабсорбується і бере участь у печінково-кишковій циркуляції. У жовчі виявлені холева (ХК – 3а, 7а, 12а–

триоксихоланова), дезоксихолева (ДХК – 3 α , 12 α -діоксихоланова) і хенодезоксихолева (ХДХК – 3 α , 7 α -діоксихоланова) кислоти. Основну кількість їх (70–75 %) становить холева кислота. Всі кислоти зв'язані з таурином і глікоколем (тауро- і глікокон'югати), тому вільних ЖК у жовчі немає.

Таким чином, у жовчі молодняку великої рогатої худоби виявлені тауро- і глікохолові (ТХ і ГХ), тауро- і глікодезоксихолові (ТДХ і ГДХ), тауро- і глікохенодезоксихолові (ТХДХ і ГХДХ) кислоти. Серед них дещо більше глікокон'югатів (1,1 : 1). Для вивчення патології жовчовиділення важливим є визначення співвідношення між ді- і триоксихолановими кислотами. Модуль цього відношення (ГДХ+ГХДХ+ТДХ+ТХДХ):(ГХ+ТХ) становить у середньому 0,44.

При експериментально змодельованій токсичній гепатодистрофії кількість виділюваної жовчі зменшується у 2–3 рази, уміст білірубину зростає в 1,5–1,6 рази, а холатів – знижується удвічі. Концентрація холестеролу не змінюється, тому холато-холестероловий коефіцієнт зменшується у 2–3 рази.

У молодняку, хворого на жирову гепатодистрофію, гнійний гепатит і цироз печінки, жовч стає більш в'язкою і містить невеликий осад; величина рН має тенденцію до підвищення. Уміст білірубину в жовчі збільшується удвічі, проте частка кон'югованого зменшується до 60 % (у здорових вона становить 75 %). Кількість холестеролу суттєво не змінюється: при гепатодистрофії вона дещо збільшується, а при множинних абсцесах печінки – зменшується; активність трансфераз, особливо аланінової, зростає. Зміни холатів є ідентичними. Загальна кількість їх зменшується в 1,3–1,5 рази і залежить від ступеня ураження печінки, проте вільні ЖК виявляються вкрай рідко (як виняток) і в дуже невеликій кількості. Синтез глікокон'югатів, як правило, знижується, а кількість таурокон'югатів майже не змінюється, тому співвідношення між ними зменшується у 2–2,5 рази, що є важливим діагностичним показником. Особливо зменшується синтез глікокон'югатів діоксихоланових кислот (ГДХ+ГХДХ), тому співвідношення їх із триоксихолановою глікохоловою (ГХ) кислотою [(ГДХ+ГХДХ) : ГХ] знижується до 0,35 проти 0,52 у здорового молодняку. Переважаюче зменшення кількості діоксихоланових кислот є показником розвитку застою жовчі в печінці (синдрому *холестазу*), що необхідно враховувати при лікуванні тварин, оскільки стаз жовчі призводить до всмоктування ЖК у кров з наступним розвитком синдрому *холемії*.

Внаслідок зниження концентрації ЖК у жовчі співвідношення між ними і холестеролом зменшується до 4,6 проти 6,6 у здорового молодняку. Окрім порушення утворення жовчі, важливим фактором є затримка її відтоку, внаслідок чого розвивається синдром холестазу. Це спричинює розвиток *холемії*, тобто інтоксикацію компонентами жовчі, які проникають у кров, передусім жовчними

кислотами і білірубінном. Холестаза може розвиватися всередині печінки і поза нею. Механізм виникнення внутрішньопечінкового холестазу полягає в порушенні утворення жовчних міцел, які складаються з холестеролу, жовчних кислот, фосфоліпідів і білірубіну. Основною причиною цього є, очевидно, зменшення утворення ЖК із холестеролу. Іншою причиною може бути збільшення проникності жовчних капілярів, унаслідок чого втрачається велика кількість рідини, що викликає згущення жовчі, та з клітин у жовчні капіляри просочується білок (*альбумінохолія*), який підвищує в'язкість жовчі. Такі зміни зумовлюють утворення жовчних тромбів.

В основі холестазу, який виникає поза печінкою, лежить затримка відтоку жовчі, спричинена механічними факторами (пухлини, цироз, абсцеси, ехінококоз та інші гельмінтози, жовчні камені). Тиск жовчі у жовчних протоках підвищується до 270 мм вод. ст., що призводить до розширення і розриву жовчних капілярів та потрапляння жовчі у кров або лімфатичні судини. Окрім того, внаслідок підвищення тиску в жовчному дереві підвищується екскреція жовчі із гепатоцитів, у яких розвиваються дистрофічні процеси, порушується жовчоутворення, тобто включаються патогенетичні механізми холестазу. При цьому в кров потрапляють жовчні кислоти (холемія), кон'югований білірубін та інші компоненти жовчі. Токсична дія їх проявляється депресією, збудженням блукаючого нерва і внаслідок цього – зменшенням частоти пульсу, розщепленням або роздвоєнням другого тону, розладами функцій травного каналу, шкірним свербіжем.

Однією з причин холестазу може бути закупорення жовчних протоків жовчними каменями (холелітіаз), механізми утворення яких на сьогодні поки що недостатньо вивчені. Ряд дослідників висловлюють припущення, що основним фактором, який зумовлює розвиток холелітіазу, є хвороби самої печінки і зумовлені ними зміни складу жовчі, передусім зменшення в ній концентрації холатів, які разом із фосфоліпідами утримують холестерол у розчиненому стані. Співвідношення між умістом ЖК і холестеролом у жовчі зменшується, стабільність жовчних міцел порушується, і холестерол випадає в осад. Розвитку холелітіазу сприяє холестаза.

Інші дослідники пов'язують виникнення захворювання з катаральним запаленням жовчних протоків (холангітом) і жовчного міхура (холециститом), які виникають внаслідок проникнення бактерій або розвитку гельмінтозів (фасціольоз, дикроцеліоз). При холангіті і холециститі знижується величина рН жовчі, що спричинює випадання холестеролу у вигляді кристалів і утворення камінців. Крім того, при запаленні з ексудатом виділяються білкові речовини, що також зумовлює порушення колоїдного та хімічного складу жовчі, внаслідок чого в осад випадають холестерол, кальцій і білірубін.

За хімічним складом жовчні конкременти поділяють на три групи: холестеролові, змішані і пігментні.

Холестеролові камінці містять мало вапна, пігменту і білка.

Змішані камінці містять 60–80 % холестеролу та значні домішки білірубіну і кальцію карбонату.

Пігментні камені складаються з білірубіну і вапна з невеликими домішками холестеролу. Зустрічаються вони рідко, частіше при хронічних патологічних процесах, зумовлених посиленням гемолізом еритроцитів. Рідко можуть зустрічатися карбонатні камені, що складаються з вуглекислого кальцію.

Жовчні конкременти не викликають характерних біохімічних змін, за якими їх можна діагностувати. При затриманні відтоку жовчі внаслідок закупорення камінцем настають зміни в крові, сечі і калі, які є типовими для механічної жовтяниці (збільшення в крові кон'югованого білірубіну, виділення його із сечею, розвиток синдрому холемії, зміна кольору фекалій (у зв'язку зі зменшенням виділення стеркобіліну).

Разом із жовчю з печінки виділяється багато речовин. Для вивчення екскреторної функції печінки використовують бромсульфалеїнову пробу. Фарба, введена в організм внутрішньовенно, швидко виділяється печінкою і через 45 хв у сироватці крові виявляється в незначній кількості (не більше 5 %). При експериментально змодельованому токсичному та гострому паренхіматозному гепатиті затримка фарби становила дещо більше 20 %. З цією метою можна використовувати бромфеноловий синій. У корів, хворих на токсичну гепатодистрофію, показники проби погіршувалися в міру прогресування патологічного процесу і відновлювалися при їх одужанні.

У клінічно здорового молодняка фарба починає виділятися із жовчю уже через 2–3 хв після внутрішньовенного введення, а через 30 хв у сироватці крові виявляють лише сліди її в окремих тварин. При експериментальній токсичній гепатодистрофії концентрація бромфенолового синього в жовчі помітно зростає лише через 7–8 хв після введення, а в сироватці крові навіть через 60 хв ще залишається 15,0 % введеної фарби, що свідчить про порушення як процесів поглинання фарби із крові, так і екскреції її в кишечник (Левченко В.І., 1986).

Значення функціональних проб для діагностики захворювань печінки.

Велика кількість функцій печінки знаходить своє відображення в тих лабораторних дослідженнях, які запропоновані для оцінки її функціонального стану. І не випадково, що кількість цих методів досягає кількох сотень. Проте не завжди при одному й тому ж патологічному процесі змінюються всі функції печінки. Окрім того, печінка має значні компенсаторні можливості. Тому всі

біохімічні зміни, які виявляють при її патології, запропоновано об'єднувати в біохімічні синдроми.

Сьогодні виділяють такі синдроми:

- а) запалення;
- б) цитолізу;
- в) гепатоцелюлярної недостатності (гепатодепресивний);
- г) холестазу; д) мінерально-вітамінної патології;
- е) гепатоцеребральний;
- ж) гепаторенальний.

Синдром запалення характеризується підвищенням концентрації імуноглобулінів (Ig), зниженням альбуміно-глобулінового (А/Г) відношення в середньому в 1,5–2 рази, гіперпротеїнемією, збільшенням умісту глобулінів, позитивними колоїдно-осадовими пробами (сулемовою, формоловою, тимоловою, з міді сульфатом).

Синдром цитолізу свідчить про пошкодження клітин або навіть про їх некроз. Він характерний для паренхіматозного і гнійного гепатиту, гепатодистрофії та некрозу гепатоцитів. Унаслідок цього ряд сполук, що містяться в гепатоцитах, елімінуються в кров. Це стосується, передусім, клітинних ферментів. Синдром цитолізу гепатоцитів характеризується підвищенням активності індикаторних для печінки ферментів: аспартат- і аланінамінотрансфераз (АСТ і АЛТ), глутамат-дегідрогенази (ГЛДГ), сорбітолдегідрогенази (СДГ), лактатдегідрогенази (ЛДГ₅). Окрім гіперферментемії, при синдромі цитолізу має місце збільшення концентрації кон'югованого білірубіну в сироватці крові.

При аналізі синдрому цитолізу враховують біохімічні особливості ензимів, їх активність у клітинах печінки, локалізацію в різних органелах клітини, стадію перебігу хвороби та її характер (запалення, дистрофія, цироз чи некроз печінки та вид тварини). Наприклад, СДГ має відносно незначну активність у гепатоцитах, тому збільшення її активності у крові реєструється лише при значному ураженні паренхіми. Активність АСТ, АЛТ, ЛДГ досить висока в гепатоцитах, тому навіть незначне їх пошкодження викликає зростання активності цих ензимів у крові. Деякі ферменти або їх ізоферменти локалізуються в цитоплазмі клітини або її органелах, тому визначення їх активності дозволяє харак-теризувати ступінь цитолізу гепатоцитів. Ферменти, що локалізуються в цитоплазмі, легко проникають через клітинну мембрану, а ті, що містяться в органелах, елімінуються в кров повільніше.

Ферменти досить чітко характеризують перебіг хвороби (гострий чи хронічний). Наприклад, при гострому перебігу гепатиту активність АСТ підвищується у 5–10 разів, при хронічному – в 1,5–3 рази.

Синдром цитолізу залежить також від характеру хвороби. Наприклад, активність АСТ збільшується в корів, хворих на гепатодистрофію, у 2–4 рази, при гострому перебігу гепатиту – у 5–10 разів, хронічному – у 2–3 рази, некрозі гепатоцитів – у десятки разів, а при цирозі печінки активність незначно зростає або залишається без змін.

Слід також зазначити, що підвищення активності окремих ензимів залежить від виду тварин. Для великої рогатої худоби і коней більш типовим є збільшення активності АСТ, ніж АЛТ, для свиней і кішок – навпаки, у собак зростає активність обох ферментів, проте дещо виразніше – активність АЛТ.

Гепатодепресивний синдром, або *синдром гепатоцелюлярної недостатності*, зумовлюється порушенням синтезу ряду речовин, які утворюються лише в печінці. Характеризується він зменшенням синтезу альбумінів, жовчних кислот, ефірозв'язаного холестеролу, сечовини, 25-гідроксихолекальциферолу та активності холінестерази, яка синтезується в гепатоцитах. Зниження активності ензиму в плазмі (сироватці) корелює з глибиною і ступенем ураження гепатоцитів.

Синдром холестазу характеризується підвищенням активності ферментів – гаммаглутамілтрансферази (ГГТ, або ж гаммаглутаміл-транспептидази – ГГТП), печінкового ізоферменту лужної фосфатази (ЛФ), 5-нуклеотидази, концентрації кон'югованого білірубину, зменшенням відношення ді- до триоксихоланових кислот, збільшенням концентрації в сироватці крові жовчних кислот та виділенням їх і кон'югованого білірубину із сечею.

Синдром мінерально-вітамінної недостатності характеризується специфічною ознакою – зменшенням синтезу метаболітів ерго- (25ОНD₂) та холекальциферолу (25ОНD₃), який проходить лише в гепатоцитах; біологічно активних метаболітів тіаміну – тіаміндифосфату (кокарбоксілази) та ніацину – нікотинаміду, коферментів флавінових ферментів – флавінаденінмоно- і динуклеотиду (ФМН і ФАД). Зниження синтезу жовчних кислот при патології печінки негативно впливає на абсорбцію жиророзчинних вітамінів та важкорозчинних солей кальцію. Унаслідок гепатодистрофії та гнійного запалення печінки зменшується депонування ретинолу. Такий комплекс змін викликає розвиток ендегенних А- і D-гіповітамінозів. У сироватці крові хворих тварин при цьому виявляють зменшення вмісту кальцію, неорганічного фосфору, калію, магнію та підвищення активності лужної фосфатази, особливо її печінкового і кишкового ізоферментів.

Гепатоцеребральний синдром характеризується порушенням функцій центральної нервової системи внаслідок накопичення в організмі не знешкоджених хворою печінкою токсичних продуктів (аміаку, фенолів, індолу, меркаптану), низькомолекулярних жирних кислот (масляної, валеріанової,

капронової), ароматичних (фенілаланіну, тирозину, триптофану) та сірковмісних (метіоніну) амінокислот, кетонних тіл, некон'югованого білірубіну, які патогенно впливають на мозкову тканину, зумовлюючи розвиток печінкової енцефалопатії та печінкової коми.

Ендотоксини проникають через ГЕБ у мозкову рідину. Зокрема, концентрація аміаку в лікворі збільшується при цьому в десятки разів. Ендотоксини викликають ураження центральної нервової системи, про що свідчать зміни ліквору хворих тварин. Спинномозкова рідина стає червоною (*еритроцитрагія*) або кавово-жовтою (*ксантохромія*) – внаслідок нагромадження гемоглобіну та білірубіну, каламутною. У ній збільшується кількість лейкоцитів (*плеоцитоз*), загального білка (*гіперпротеїнемія*) – за рахунок глобулінових фракцій, зростає активність індикаторних для мозку ферментів – креатин-кінази (при печінковій енцефалопатії – удвічі, а печінковій комі – у 14 разів) та лужної фосфатази. Висока активність креатинкінази свідчить про деструкцію клітин мозку – нейроцитів, а лужної фосфатази – про ураження їх мембран.

При *гепаторенальному синдромі* характерним є розвиток функціональної недостатності нирок у тварин із патологією печінки. Порушення знешкоджувальної функції печінки призводить до накопичення в організмі ендотоксинів, зокрема аміаку, реніну, ангіотензину, простагландинів, які пошкоджують структуру і знижують функціональні можливості нирок. У тварин при цьому синдромі одночасно діагностують ураження печінки і нирок (набряки, протеїнурію, глюкозурію, гематурію, збільшення вмісту сечовини і креатиніну в сироватці крові, підвищення активності гаммаглутамілтранспептидази – ГГТП в сечі). Наявна в сечі ГГТП ниркового походження. Фермент виділяється в сечу із зруйнованих клітин проксимальних відділів каналців, які містять його у високій концентрації. Гепаторенальний синдром часто виявляють у високопродуктивних корів та собак службових порід. Аналіз показників функціонального стану печінки та нирок підтверджує послідовність розвитку такої патології.

Контрольні запитання.

1. Назвіть функції жовчі.
2. Які найбільш важливі компоненти жовчі?
3. Які зміни фізичних властивостей і хімічного складу жовчі при хворобах печінки?
4. Поділ жовчних конкрементів за хімічним складом.
5. Значення функціональних проб для діагностики захворювань печінки.
6. Синдром запалення.

7. Синдром цитолізу.
8. Гепатодепресивний синдром.
9. Синдром холестазу.
10. Синдром мінерально-вітамінної недостатності.
11. Гепатоцеребральний синдром.
12. Гепаторенальний синдром.

ТЕМА 5. БІОХІМІЯ І ПАТОБІОХІМІЯ КРОВІ

Анотація: У розділі розкрито найбільше важливі питання з біохімії і патобіохімії гемоглобіну, дихальної функції крові, біохімії і патобіохімії згортання крові, система згортання крові, механізм згортання крові, протизгортаюча система крові .

Біохімія і патобіохімія гемоглобіну.

Зрілі еритроцити ссавців майже цілком заповнені гемоглобіном. Він є складним залізовмісним білком (хромопротеїном) з молекулярною масою близько 66000. Гемоглобін складається із білкової частини – *глобіну*, частка якого становить 96 % від маси гемоглобіну, і небілкового компонента – *гему* (4 %). Видова різниця гемоглобіну зумовлена глобіном, у той час як гем має однакову будову. Глобін складається із 4 поліпептидних ланцюгів, два з яких називаються α -ланцюгами (містять по 141 амінокислотному залишку), а два інших – β -ланцюгами (містять по 146 амінокислот). Зміни в первинній структурі ланцюгів глобіну, тобто заміна окремих амінокислотних залишків іншими, є причиною ряду вроджених анемії, утворення значної кількості аномальних гемоглобінів.

Нині відомі три типи нормальних гемоглобінів: А, F і Р, які відрізняються за будовою поліпептидних ланцюгів. У крові ембріона міститься Hb P (примітивний). Після третього місяця внутрішньоутробного розвитку плода людини утворюється фетальний гемоглобін (Hb F), який містить два α - і два γ -ланцюги. Він поступово замінюється на гемоглобін дорослої людини і тварини (Hb A). Якщо кров новонародженого містить до 80 % Hb F, то на кінець першого року життя в крові дитини залишається лише 1–2 % Hb F, решта належить до типу А. Вважають, що існують три різні види молекул гемоглобіну типу А – Hb A₁, Hb A₂ і Hb A₃. У дорослих людей основним є Hb A₁, частка якого в загальній кількості гемоглобіну становить 96–98 %; на Hb A₂ припадає 2–3 %, Hb A₃ – менше 1 %.

До складу молекули гемоглобіну входять чотири геми, кожний із яких містить один атом двовалентного заліза, зв'язаного з двома атомами азоту. Гем у вигляді гем-

порфірину є простетичною групою не лише гемоглобіну, а й міоглобіну, каталази, пероксидази та цитохромів *b*, *c* і *c₁*. Кожний із 4-х атомів заліза, що входять у молекулу гемоглобіну, може приєднати лише одну молекулу кисню, у результаті чого утворюється оксигемоглобін (Hb O₂) – сполука молекулярного кисню з гемоглобіном. Кисень приєднується до кожного гему молекули. Причому, приєднання однієї молекули полегшує приєднання другої молекули і т.д.

Окрім кисню, гемоглобін легко з'єднується з іншими газами, зокрема з CO₂ (*карбгемоглобін*) і CO (*карбоксихемоглобін*). Швидкість утворення карбоксихемоглобіну в 160 тис. разів вища, ніж швидкість дисоціації. Для порівняння зазначимо, що швидкість утворення оксигемоглобіну перевищує швидкість дисоціації його лише в 1 тисячу разів. Гемоглобін у складі карбоксихемоглобіну втрачає здатність приєднувати кисень, і настає смерть клітин.

При отруєнні оксидами азоту частина гемоглобіну окиснюється в *метгемоглобін* (HbOH), який містить тривалентне залізо і тому не приєднує кисень, що спричинює розвиток гіпоксії. При сполученні гемоглобіну із сульфаніламидами утворюється сульфгемоглобін, який також не може транспортувати кисень.

Вивчення первинної структури субодиниць молекули гемоглобіну стимулювало дослідження структури так званих аномальних гемоглобінів. У крові людини виявлено понад 150 різних типів мутантних гемоглобінів, які виникають внаслідок мутації генів, що викликає зміни амінокислотного складу ланцюгів глобіну. Поява в крові змінених ланцюгів глобіну зумовлює розвиток характерних анемії, які одержали назву *гемоглобінозів*. Їх поділяють на дві групи: а) *гемоглобінопатії*, причиною розвитку яких є спадкова зміна структури певного ланцюга нормального гемоглобіну; б) *талісемії*, які зумовлюються спадковим порушенням синтезу будь-якого нормального ланцюга гемоглобіну. Окрім того, вирізняють також *залізодефіцитні анемії*. Нерідко в крові виявляють кілька патологічних типів гемоглобіну. Такі гемоглобінози називаються *змішаними*.

Класичним прикладом спадкової гемоглобінопатії є серпоподібноклітинна анемія, досить поширена в країнах Південної Америки, Африки та Південно-східної Азії. При цій патології еритроцити в умовах низького парціального тиску кисню набувають форми серпа, швидко розвивається їх гемоліз. Біохімічний дефект при такій анемії проявляється заміною лише однієї амінокислоти – глутамінової – на валін у β-ланцюгах молекули гемоглобіну (Hb S). Усі інші амінокислоти розташовуються в такій же послідовності і становлять таку ж кількість, як і в нормальному гемоглобіні (Hb A). Однієї заміни достатньо не

тільки для порушення форми еритроцита, але й для розвитку тяжкої спадкової хвороби – серпоподібноклітинної анемії.

Таласемія – це генетично зумовлене порушення синтезу одного з нормальних ланцюгів гемоглобіну. Якщо пригнічується синтез β -ланцюгів, то розвивається β -таласемія; при генетичному дефекті синтезу α -ланцюгів розвивається α -таласемія. При β -таласемії в крові з'являється до 15 % Hb A₂ і різко збільшується кількість Hb F – до 15–60 %. Хвороба характеризується руйнуванням кісткового мозку, ураженням печінки і селезінки, супроводжується гемолізом еритроцитів.

Анемії виникають не лише в результаті порушення синтезу білкової частини гемоглобіну (глобіну) і появи патологічних його форм, але й при порушенні досить складного шляху синтезу гему. У реакціях його синтезу беруть участь ферменти, відсутність яких або пригнічення їх активності призводить до “патологічного” синтезу, у результаті чого замість уропорфіриногену-III утворюється уропорфіриноген-I, який не використовується для синтезу гему. У цьому випадку розвивається тяжка патологія – уроджена порфірія із симптомами порфіринурії.

До первинних порфірій належить також гостра порфірія, при якій блокується перетворення порфобіліногену в поліпіроли, тому збільшується виділення із сечею δ -амінолевулінової кислоти і порфібіліногену.

Нестача заліза в організмі викликає порушення останнього етапу синтезу гему – перетворення протопорфірину IX у гем. У результаті цього розвивається анемія, яка супроводжується збільшенням умісту порфіринів, зокрема протопорфірину IX в еритроцитах.

З інших форм анемій необхідно виділити злякисну, або перніціозну, анемію (хворобу Адісона-Бірмера), для якої характерний мегалобластичний тип кровотворення. Захворювання виникає внаслідок ендогенного В₁₂-гіповітамінозу (або В₁₂- і В_с- гіповітамінозів) і пов'язане з порушенням синтезу ДНК та обміну нуклеопротейнів. Кількість еритроцитів і гемоглобіну при цьому знижується, порівняно з нормою, у кілька разів. Характерною ознакою захворювання є зростання колірної показника і вмісту гемоглобіну в 1 еритроциті (ВГЕ) внаслідок збільшення удвічі об'єму еритроцитів.

Окремі форми анемій, зокрема спадкові, мало досліджені в сільськогосподарських тварин і вивчені переважно в собак різних порід та частково у котів і коней. Так, спадкову (аутосомну) гемолітичну анемію, зумовлену дефіцитом в еритроцитах ферменту піруваткінази, виявлено в білих тер'єрів та абісинських котів, а дефіцит фосфофруктокінази – в окремих видів англійських та американських спанієлів.

Дихальна функція крові.

Дихальна функція крові пов'язана з перенесенням кисню від легень до тканин і вуглекислоти – від тканин до легень. У стані спокою тканини й органи людини використовують близько 200 мл кисню за хвилину. При тяжкому фізичному навантаженні кількість кисню, яка необхідна тканинам, збільшується до 2–3 л. Доставка такої кількості кисню у вигляді газу, розчиненого в плазмі, неможлива. Таку функцію кров виконує лише завдяки наявності в ній гемоглобіну. У кожному еритроциті міститься близько 300 млн молекул гемоглобіну. У легеневих капілярах проходить насичення гемоглобіну киснем, а в капілярах тканин, де парціальний тиск кисню різко знижений, відбувається віддача кисню тканинам.

Молекула гемоглобіну може зв'язувати при максимальному насиченні киснем 4 молекули O_2 , проте кожен гем приєднує кисень не самостійно і не незалежно один від одного, а разом, кооперативно. Кооперативність цього процесу полягає в тому, що кожна наступну молекулу кисню гемоглобін приєднує і віддає легше, ніж попередню, тобто, якщо перший гем насичується киснем за 0,0072 с, то другий – за 0,0018, третій за – 0,0003 і четвертий – за 0,0007 с. Оксигенація 4-го гему проходить у десятки разів швидше, ніж першого. Така особливість насичення гемів киснем одержала назву гем-гем-взаємодії. Важливим є те, що процес приєднання молекулярного кисню до гемоглобіну не супроводжується зміною валентності заліза гему (воно залишається двовалентним, через що він отримав назву оксигенації, а не окиснення).

Гемоглобін містить 0,335 % Fe. 1 грам-молекула заліза (атомна маса 55,84) приєднує 22,4 л кисню. Отже, 100 г гемоглобіну повинні зв'язувати $(0,335 \times 22400) : 55,84 = 134$ мл O_2 . Тобто, 1 г гемоглобіну людини зв'яже близько 1,34 мл O_2 , у той час як коня – 1,33, корови – 1,0–1,5, свині – 1,68, собаки – 1,55–1,65 мл. Кількість кисню, який зв'язується гемоглобіном, що міститься в 100 мл крові, називається *кислотою ємністю крові*. Для людей вона становить близько 19 мл, а для тварин різних видів – від 10,0 до 19,5 мл.

Ступінь насичення гемоглобіну киснем залежить від парціального тиску кисню (pO_2) в артеріальній крові: при 80 мм рт. ст. гемоглобін насичується киснем на 96 %. У венозній крові при pO_2 40 мм рт. ст. гемоглобін насичений киснем на 70–72,5 %. Таким чином, у венозній крові міститься близько 14 мл кисню $(15 \times 134 \times 70) : 10000 \approx 14$. Артеріовенозна різниця становить близько 5 мл.

Збільшення інтенсивності окиснювальних процесів супроводжується більш повним вилученням кисню з крові, яка протікає по тканинних капілярах: насичення гемоглобіну киснем при цьому зменшується до 30–33 %. Тобто, уміст кисню у венозній крові становить 6–6,5 об %, а артеріовенозна різниця збільшується до 13,5–14 об %.

В артеріальній крові майже увесь гемоглобін знаходиться у вигляді оксигемоглобіну. Цей стан забезпечується високим парціальним тиском кисню в повітрі, яке потрапляє в легені. Залежність між ступенем насичення гемоглобіну киснем і парціальним тиском кисню в повітрі можна зобразити на графіку у вигляді кривої, яка має S-подібну форму. Така форма кривої насичення гемоглобіну киснем (її називають кривою дисоціації оксигемоглобіну) має велике фізіологічне значення. Як видно з рисунка, при такій формі кривої забезпечується можливість насичення крові киснем при зміні його парціального тиску в широких межах: дихальна функція суттєво не порушується, наприклад, при зниженні pO_2 із 100 до 60–70 мм рт. ст.

У тканинних капілярах в оптимальних умовах pO_2 залишається досить високим (близько 40 мм рт. ст.), завдяки чому забезпечується швидка дифузія кисню із капілярів у тканини. Якщо pO_2 у артеріальних капілярах становить менше 5 мм рт. ст., клітини втрачають здатність поглинати кисень із крові.

У стані гіпоксемії будь-якої етіології організм вимушений частково переключатися на анаеробний тип обміну (гліколіз і глікогеноліз), тому при тяжкому фізичному навантаженні і гіпоксемії вміст молочної кислоти в крові, як правило, збільшується.

Слід зазначити, що в момент скорочення м'язів, особливо міокарда, кров витискується із судин, що ускладнює надходження кисню в клітини. Цей несприятливий фактор забезпечення м'язів киснем значною мірою компенсується наявністю у волокнах скелетних і серцевого м'язів особливого пігменту – міоглобіну, який, як і гемоглобін, зв'язує кисень.

Різниця полягає в тому, що кожна молекула міоглобіну складається з одного гему і тому може зв'язувати лише одну молекулу O_2 .

Проте спорідненість міоглобіну до кисню надзвичайно висока, і навіть при pO_2 20 мм рт. ст. насичення його киснем досягає 85 %, а при 40 мм – 95 %. Тому міоглобін, на відміну від гемоглобіну, не може транспортувати кисень, оскільки він не віддає його тканинам так ефективно, як оксигемоглобін. Таким чином, у м'язах тіла певна кількість кисню завжди міститься у зв'язаній з міоглобіном формі, особливо ж велика вона в м'язах морських тварин (тюлень, кит, дельфін).

В організмі людини, яка не виконує роботу, щохвилини з легень у тканини транспортується близько 200 мл кисню. Приблизно така ж кількість вуглекислоти переноситься від тканин до легень.

Організм має кілька механізмів перенесення CO_2 . Досить незначна частина його (12–15 мл за 1 хв, або 6–7 % всієї кількості) переноситься плазмою крові у фізично розчиненому стані. Певна кількість CO_2 (3–10 %) приєднується до вільної аміногрупи гемоглобіну з утворенням карбгемоглобіну:

Карбгемоглобін є нестійкою сполукою і в легeneвих капілярах надзвичайно швидко дисоціює, від'єднуючи CO_2 , який видаляється з видихуванним повітрям. Вважають, що обидві реакції відбуваються без участі ферментів.

Основна маса вуглекислоти переноситься з кров'ю до легень у формі гідрокарбонату. У механізмі перенесення CO_2 від тканин до легень важливу роль виконує гемоглобін еритроцитів. Суть цього процесу полягає в наступному. Оксигемоглобін, що надходить з артеріальною кров'ю в тканини, є більш сильною кислотою, ніж H_2CO_3 . Він зв'язаний із калієм і позначається як KHbO_2 . У периферичних капілярах великого кола кровообігу оксигемоглобін еритроцитів віддає кисень тканинам. Утворений гемоглобін є надзвичайно слабкою органічною кислотою, калійна сіль якої майже повністю розщеплюється навіть такою слабкою кислотою, як вугільна.

Одночасно в еритроцит надходить продукт обміну – вуглекислий газ. Під впливом ферменту карбоангідрази CO_2 взаємодіє з водою. При цьому утворюється вугільна кислота. Надлишок іонів водню зв'язується з гемоглобіном, а утворені аніони HCO_3^- зразу ж дифундують із еритроцитів у плазму:

Замість цих іонів в еритроцит надходять іони хлору, тобто в еритроцитах зростає концентрація KCl , у той час як натрій, інша складова частина натрію хлориду, що міститься в крові, залишається в плазмі. Унаслідок цього в плазмі крові збільшується вміст натрію гідрокарбонату – NaHCO_3 .

У легeneвих капілярах проходить витіснення вугільної кислоти із NaHCO_3 оксигемоглобіном, який утворюється після приєднання кисню до H-Hb :

Утворена вугільна кислота швидко розщеплюється за участі карбоангідрази на вуглекислий газ і воду. Низький парціальний тиск CO_2 у просвіті альвеол сприяє дифузії його із еритроцитів у легені, звідки він виділяється разом із видихуванним повітрям.

Таким чином, у формі гідрокарбонату за участі гемоглобіну еритроцитів із кров'ю до легень транспортується більше 80 % усієї кількості CO_2 , яка переноситься від тканин до легень.

У процесах дисоціації H_2CO_3 на H_2O і CO_2 в легeneвих капілярах і утворення H_2CO_3 із CO_2 і H_2O у капілярах тканин важливу роль виконує фермент карбоангідраза, яка більш ніж у 1000 разів прискорює ці реакції.

Біохімія і патобіохімія згортання крові. Здатність крові до згортання з утворенням тромба, або згустку у просвіті дрібних кровоносних судин при їх пошкодженні була відома людям з давніх часів. Лише при деяких уроджених захворюваннях – різних формах гемофілії – здатність крові до згортання різко порушується. Перші дані про механізми згортання крові були описані 130 років

тому. Основні положення теорії Шмідта-Моравітца (протромбін – тромбін – фібриноген – фібрин) зберігають своє значення і донині.

Протромбін переходить в активний тромбін під впливом іонів кальцію і тромбокінази, яка міститься в тромбоцитах і звільняється при їх руйнуванні (I фаза). Потім під впливом утвореного тромбіну фібриноген перетворюється у фібрин (II фаза). Порівняно проста теорія Шмідта-Моравітца в подальшому значно ускладнилась новими даними, які “перетворили” згортання крові у складний ферментативний процес.

Система згортання крові

Згортання крові – це процес переходу крові з рідкого стану в желеподібний згусток. Цей процес є захисною біологічною реакцією, яка охороняє організм від утрати крові при порушенні цілісності судин. У процесі згортання крові беруть участь компоненти плазми, тромбоцитів і тканин, які називаються факторами згортання крові. Організмом вони виробляються в неактивному стані. Якщо з них утворюються активні фактори, то до їх позначення добавляється буква “а”.

Фібриноген (фактор I) – це білок плазми крові, який синтезується в печінці. Під впливом ферменту тромбіну від фібриногену від’єднуються пептиди А і В, і фібриноген перетворюється в добре розчинний у плазмі крові фібрин-мономер, який швидко полімеризується у фібрин-полімер:

Нитки фібрин-полімеру легко склеюються одна з одною і стінками судин, утворюючи густу сітку, яка заповнюється форменими елементами і рідкою частиною крові. Внаслідок цього рідка частина крові перетворюється в желеподібну масу (згусток крові). Так формується тромб, який закриває просвіт судин на місці їх пошкодження. Для полімеризації ниток фібрину необхідні іони кальцію.

Через 1–4 год після утворення згустку нитки фібрину скорочуються, що зменшує об’єм згустку і відділяє від нього частину рідини. Цей процес називається *ретракцією згустку*.

Кровотечі, зумовлені вродженою недостатністю фібриногену або повною його відсутністю в крові, трапляються досить рідко. Зниження вмісту фібриногену в крові спостерігається при цирозі печінки або при посиленому розщепленні його (фібринолізу) фібринолізином після ускладнених пологів та при деяких пухлинах.

Протромбін (фактор II) є неактивним попередником тромбіну – ферменту, який викликає згортання (полімеризацію) фібриногену. Недостатність протромбіну може бути вродженою або набутою (при хворобах печінки, де він синтезується, та за нестачі вітаміну К, у синтезі якого вітамін бере активну участь).

Тромбін є протеолітичним ферментом, який перетворює фібриноген спершу у фібрин-мономер, а потім у фібрин-полімер. Тромбін утворюється в плазмі із протромбіну під впливом ряду факторів: активного тромбіну, тромбокінази (повного тромбопластину крові), тромбопластину тканин, іонів Са, білків плазми крові – акцелерину і конвертину.

Тромбопластин (фактор III) необхідний для перетворення протромбіну в активний тромбін. Він являє собою систему, яка складається із кількох факторів згортання. Окрім фактора 3 тромбоцитів, до них належать не менше 5 інших факторів, які інколи називають тромбопластином плазми: фактори Хагемана (ф. XII), Розенталя (ф. XI), Процера-Стюарта (ф. X), Крістмана, або антигемофільний фактор В (ф. IX), і антигемофільний фактор А (ф. VIII). Усі вони є білками плазми крові. До складу тромбопластину крові входять також іони кальцію (ф. IV).

Таким чином, перша фаза згортання крові – перетворення протромбіну в активний тромбін під впливом тромбокінази – на сучасному етапі досліджень доповнена ланкою, яка одержала назву *профази*.

Для перетворення протромбіну в активний тромбін, окрім тромбопластину крові (тромбокінази за Шмідтом), необхідні ще кілька факторів:

- а) білки плазми крові – проакцелерин і проконвертин, які легко перетворюються у свої активні форми (акцелерин і конвертин);
- б) тромбопластин тканин.

Іони кальцію (фактор IV). У процесах згортання крові беруть участь лише іони кальцію сироватки крові. Вони необхідні на всіх фазах згортання: для утворення тромбопластину, разом із тромбіном діють на фібриноген, забезпечують стабілізацію тромба.

Тканинний тромбопластин, або *тромбопластин тканин*, утворюється при пошкодженні тканин. У здорових людей і тварин, він, як правило, не надходить у циркулюючу кров у великих кількостях. Він, в основному, бере участь у локальному гемостазі. У його утворенні беруть участь фактор X плазми, конвертин і акцелерин.

Проакцелерин (фактор V). Фактором V називають також його активну форму – акцелерин, або сироватковий А_c-глобулін (**фактор VI**). Сліди тромбіну можуть перетворювати проакцелерин у його активну форму – акцелерин, а утворений акцелерин у свою чергу бере участь у системі, яка каталізує утворення протромбіну (активного тромбопластину) і перетворення протромбіну в тромбін. Оскільки фактор V синтезується в печінці, то ураження її призводить до зменшення синтезу і вмісту цього фактора в плазмі, що знижує швидкість згортання крові.

Конвертин (фактор VII) входить до складу системи, яка стимулює перетворення протромбіну в тромбін. Цей фактор необхідний для утворення

тканинного тромбoplastину. Конвертин (проконвертин) синтезується в печінці, тому ураження печінки і нестача вітаміну К різко знижують уміст фактора VII у крові, що впливає на швидкість згортання крові.

Антигемофільний глобулін А (фактор VIII) є одним із найважливіших компонентів системи згортання крові (тромбoplastину). Він активує фактор IX. Уроджена нестача фактора VIII є причиною гемофілії А, яка найчастіше реєструється в людей (85–88 % від спадкових порушень згортання крові) і рідко зустрічається серед сільськогосподарських тварин, переважно у коней і свиней (частіше хворіють собаки).

Антигемофільний глобулін В (фактор IX) бере участь в утворенні тромбoplastину плазми, активується фактором XI. Уроджена відсутність його є причиною гемофілії В, частка якої серед загальної кількості хворих на гемофілію людей становить 6–13 %.

Фактор X бере участь в утворенні тромбoplastину плазми і синтезується клітинами печінки. Синтез його залежить від умісту в печінці вітаміну К.

Фактор XI бере участь у синтезі тромбoplastину плазми. Нестача його призводить до розвитку гемофілії С.

Фактор Хагемана (фактор XII) бере участь у початковій стадії утворення тромбoplastину плазми. У хворих із вродженою відсутністю цього фактора спостерігається збільшення тривалості згортання крові при відсутності кровотечі. Фактор Хагемана активує фактор XI. Він бере участь не лише у згортанні крові, а й у фібринолізі.

Фактор Флетчера – прекалікреїн плазми бере участь в реакції коагуляції у фазі контакту. Під впливом фактора XIIа трансформується в калікреїн.

Фактор Фітцджеральда – високомолекулярний кініноген плазми, який активується калікреїном у кінін. Бере участь в активації фактора XI.

Фібриностабілізуючий фактор (фактор XIII) сприяє утворенню міцних міжмолекулярних зв'язків у фібрин-полімері. Активується тромбіном у присутності іонів кальцію.

Окрім факторів плазми і тканин, в утворенні системи згортання крові беруть участь фактори, зв'язані з *тромбоцитами* (кров'яними пластинками). Дозрілі тромбоцити циркулюють як без'ядерні диски, оточені тришаровою ліпопротеїновою оболонкою, мають три типи гранул і систему внутрішніх каналців, які дозволяють умісту гранул звільнитися в напрямку поверхні тромбоцитів. При пошкодженні стінки судин відкриваються субендотеліальні елементи, тобто базальна мембрана, колаген і міофібрили. Циркулюючі тромбоцити взаємодіють з колагеном, їхня форма з дископодібної змінюється на сферичну з псевдоподіями. До одинарного шару тромбоцитів приєднуються наступні, утворюючи агрегати, для чого необхідна також присутність

фібриногену і фібронектину. Різні індуктори агрегації (колаген, серотонін, арахідонова кислота і її метаболіти) реагують із тромбоцитарними рецепторами, що посилює агрегацію.

Фактор 1 тромбоцитів – це адсорбований на поверхні тромбоцитів проакцелерин (або Ас-глобулін – фактор V плазми).

Фактор 2 тромбоцитів прискорює перетворення фібриногену під впливом тромбіну, сприяє полімеризації фібрин-мономеру з утворенням фібрин-полімеру.

Фактор 3 тромбоцитів разом із тромбопластичними факторами плазми (V, VIII, IX, X) і Ca^{++} утворює повний кров'яний тромбопластин (тромбокіназу крові) – фермент, який перетворює основну кількість протромбіну в тромбін.

Фактор 4 тромбоцитів є антигепариновим фактором, який гальмує антитромбопластичну і антитромбінову дію гепарину.

Фактор 5 тромбоцитів сприяє склеюванню тромбоцитів у скупчення.

Фактор 6 тромбоцитів – серотонін – звужує кровоносні судини і зменшує проникність капілярів. Звільненню серотоніну із тромбоцитів сприяє тромбін.

Фактор 7 тромбоцитів – антифібринолізин – попереджує дію протеолітичного ферменту фібринолізину, який розщеплює фібрин і фібриноген.

Фактор 8 тромбоцитів викликає ретракцію фібрину.

Механізм згортання крові.

Процес згортання крові включає 4 фази:

перша фаза, або профаза – це протромбіназоутворення;

друга – тромбіноутворення;

третья – фібриноутворення;

четверта – ретракція і фібриноліз згустку.

У згортанні крові беруть участь фактори “внутрішні”, або внутрішньосудинні, тобто судин і крові, та “зовнішні” – тканинна система. Внутрішня система згортання починається активацією фактора Хагемана (XII) під впливом пошкодженої або зміненої стінки судин внаслідок васкулітів, атеросклерозу, інтоксикацій, дії калікреїну, насичених жирних кислот, холестеролу, трипсину.

Утворений у результаті контактної активації фактор XIIa збільшує активність прекалікреїну, який перетворюється в калікреїн, і фактора XI – плазменого попередника тромбопластину. Калікреїн трансформує фактор VII у VIIa і перетворює кініноген у кінін (рис. 27). Утворений комплекс: XIIa + фактор 3 + іони кальцію + фактор XI – за участі кініну трансформує фактор XI в XIa, який активує фактор IX. Фактор IXa разом із факторами VIII, IV (Ca^{++}) і 3 перетворює фактор X у Xa.

Комплекс факторів $Xa+V+3тф+IV$ може перетворити протромбін (II) у тромбін (IIa), тому він називається *протромбіназою*, або активним тромбопластином. Оскільки в утворенні протромбінази беруть участь фактори плазми і тромбоцити всередині судин, то цей шлях формування ферменту називається внутрішнім (внутрішньосудинним). На відміну від нього, у зовнішньому шляху формування протромбінази основну участь бере тромбопластин тканин (фактор III) який надходить у кров при їх травмуванні. Він створює з фактором VIIa та іонами Ca комплекс, який активує фактор X у Xa. Утворення протромбінази обома шляхами, як правило, відбувається одночасно, оскільки травма завжди поєднана з активацією внутрішньосудинної і тканинної систем утворення протромбінази.

Поява протромбінази (активного тромбопластину) є показником завершення першої фази (профази) згортання крові, яку ще називають контактно-калікрейнін-кінін-каскадною.

Протромбіназа (активний тромбопластин) трансформує протромбін (фактор II) у тромбін (фактор IIa). Цим завершується друга фаза згортання крові – фаза тромбіноутворення. Перші порції утвореного тромбіну каталізують утворення самого тромбіну шляхом прискорення всіх попередніх реакцій. Він активує тромбоцити, фактори V і VIII, а останній (VIIIa) у десятки разів прискорює утворення фактора Xa. Тромбін у мінімальній кількості в десятки разів збільшує спорідненість фактора V і фосфоліпідів, на які багатий фактор 3тф, що супроводжується прискоренням утворенням протромбінази і перетворенням протромбіну в тромбін.

Таким чином, поява тромбіну супроводжується циклом каталітичних реакцій, які значно прискорюють утворення протромбінази.

Третя фаза згортання крові – фаза фібриноутворення – полягає в тому, що тромбін діє на молекулу фібриногену, від якої від'єднуються два фібринопептиди – A і B, внаслідок чого вона перетворюється в мономер-фібрин, який з'єднується з іншими молекулами мономер-фібрину. Ці об'єднані мономери фібрину називаються фібрин-полімером. Вони випадають в осад, утворюючи гель і волокнисто-сітчасту структуру, яка є основою тромба.

Окрім впливу на фібриноген, тромбін активує фактор XIII, перетворюючи профібриназу (XIII) у фібриназу (XIIIa), яка забезпечує стабілізацію тромба і зменшує його чутливість до фібринолізу.

Протизгортаюча система крові

Дослідники і лікарі в різний час задумувались над питанням: чому, незважаючи на наявність досить потужної системи згортання крові, основна маса її перебуває в рідкому стані? Численні дослідження в цьому напрямку дозволили

в цілому з'ясувати природу антикоагулянтної (протизгортаючої) системи крові і стало зрозумілим, що в її утворенні, як і у формуванні системи згортання крові, бере участь цілий ряд факторів плазми крові, тромбоцитів і тканин. До цих факторів належать різні антикоагулянти – антитромбопластини, антитромбіни та фібринолітична система крові. Найбільше значення мають антитромбіни. Вважають, що в організмі існують специфічні інгібітори для кожного фактора згортання крові (антиакцелерин, антиконвертин і т. д.). Зниження активності цих інгібіторів повинно, очевидно, підвищувати згортання крові і сприяти утворенню тромбів. Підвищення активності інгібіторів, навпаки, гальмує згортання крові і може супроводжуватися розвитком геморагій.

Найбільш швидкодіючим компонентом протизгортаючої системи крові є *антитромбіни*, які належать до групи прямих антикоагулянтів, оскільки перебувають в активній формі, а не у вигляді активних попередників. Вважають, що в плазмі крові міститься близько 6 різних *антитромбінів*.

Антитромбіном I називають фібрин і фібриноген, які зв'язують (адсорбують) тромбін, який при цьому не руйнується і може звільнитися при фібринолізі.

Антитромбін II – це гепарин зі своїми кофакторами. Він гальмує вплив тромбопластину на протромбін і тромбіну – на фібриноген. Кофактор підвищує спорідненість гепарину до тромбіну і таким чином прискорює його інактивацію. Невелика кількість гепарину знаходиться на стінках судин, що сприяє розчиненню гіпотетичної плівки фібрину на ендотелії капілярів, яка, як вважають, утворюється внаслідок фізіологічного руйнування тромбоцитів у кров'яному руслі. Здатність гепарину уповільнювати згортання крові та інактивувати тромбін й інші фактори гемокоагуляції значною мірою залежить від умісту в крові антитромбіну III: чим менше останнього в плазмі, тим менша й ефективність гепарину. У свою чергу гепарин, з'єднуючись з АТ-III, значно прискорює його антикоагулянтну дію і фіксує його на поверхні ендотелію.

Антитромбін III інгібує активність тромбіну, факторів IX, X, XI і XII. У людей зі спадковою недостатністю його спостерігається схильність до утворення тромбів.

α_2 -Макроглобулін впливає лише на тромбін. Антитромбінова дія його особливо чітко виражена при депресії АТ-III.

До “непрямих антитромбінів” належать різні антагоністи факторів згортання крові: антиакцелерин, антиконвертин, антагоністи вітаміну K, який необхідний для синтезу в печінці факторів II, VII, IX, X, та інші речовини, які гальмують окремі проміжні ланки утворення тромбіну.

Контрольні запитання

1. Розкрийте питання біохімії і патобіохімії гемоглобіну.
2. Яка дихальна функції крові?
3. Біохімії і патобіохімія згортання крові.
4. Система згортання крові.
5. Який механізм згортання крові?
6. Протизгортаюча система крові .

ТЕМА 6. КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ ХВОРОБ НЕРВОВОЇ ТА СЕЧОВОЇ СИСТЕМИ

***Анотація:** У розділі розкрито питання значення порушень регуляторної дії нервової системи у патогенезі хвороб, біохімічні зміни ліквору при патологічних станах та інтерпретація одержаних результатів, одержання ліквору у ветеринарній медицині фізичні властивості ліквору, хімічне і мікроскопічне дослідження ліквору. Розглянуті питання порушення обміну речовин при хворобах нирок (нефрити, нефроз, нефросклероз, сечокам'яна хвороба) зміни хімічного складу сечі, .*

Значення порушень регуляторної дії нервової системи у патогенезі хвороб.

Клінічна біохімія при хворобах нервової системи є однією з найменше вивчених у ветеринарній медицині. Дослідження біохімічних процесів, функціонального стану та структури мозку є досить складними через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), що перешкоджає прямому надходженню продуктів обміну із клітин мозку в кров і сечу, які найчастіше використовуються як біологічні рідини у клінічній біохімії. Крім того, лише в окремих випадках виконують пункцію (біопсію) мозку, оскільки зазначена маніпуляція є дуже небезпечною і може спричинити порушення життєво важливих функцій організму і навіть смерть. Тому для вивчення патогенезу, діагностики та ефективності лікувальних заходів у тварин із патологією центральної нервової системи інформативні результати одержують при дослідженні ліквору хворих тварин.

***Біохімічні зміни ліквору при патологічних станах та інтерпретація одержаних результатів.** Ліквор (спинномозкова, або цереброспинальна рідина, *liquor cerebrospinalis*) омиває нервову тканину, циркулюючи у підпаутинному просторі, шлуночках і каналах головного та спинного мозку, через які має зв'язок з венозними та лімфатичними шляхами. Спинномозкова*

рідина утворюється в судинних сплетіннях, епендимі, м'якій оболонці мозку, нервовій тканині та глії. Продукція ліквору тісно пов'язана з її всмоктуванням або відтоком. У коней і великої рогатої худоби її загальна кількість становить від 300 до 350 мл. У тварин щохвилини утворюється 0,2–0,8 мл ліквору, і весь він поновлюється 3–7 разів на добу. Спинномозкова рідина постійно рухається у підпавутинному просторі та периваскулярних щілинах до місць її відтоку, який здійснюється через венозну та лімфатичну системи.

Ліквор в основному рухається від шлуночків до мозочково-довгастомозкової цистерни. З бокових шлуночків спинномозкова рідина надходить через міжшлуночкові отвори в порожнину третього шлуночка, а потім через середній мозок у порожнину четвертого. Звідси через серединну та бічну апертури (отвори) частина мозкової рідини потрапляє в підпавутинний простір головного та спинного мозку, насамперед у мозочково-довгастомозкову цистерну. По центральному каналу спинного мозку частина ліквору надходить каудаль-но в розширення підпавутинного простору в ділянці кінського хвоста. Далі ліквор потрапляє у підпавутинний простір спинного мозку і рухається в напрямі до головного мозку. Водночас невелика кількість його просочується в підпавутинний простір спинного мозку. У підпавутинному просторі відбувається переміщення спинномозкової рідини у вигляді коливальних рухів. На рух ліквору впливає дихання, скорочення серця, рух тіла, емоційний стан, фізичні навантаження та інші фактори. Венозна система організму, куди спинномозкова рідина потрапляє через грануляції павутинної оболонки, відіграє головну роль у видаленні ліквору з підпавутинного простору.

Лімфатична система бере участь у видаленні спинномозкової рідини завдяки тому, що периферичні та черепні нерви мають периневральні лімфатичні щілини, які сполучаються із субарахноїдальним простором. Через ці щілини (переважно нюхового, зорового та слухового нервів) ліквор потрапляє в лімфатичну систему. Можливо, що видалення мозкової рідини відбувається і через периваскулярні простори речовини мозку, які є аналогічними до лімфатичних щілин центральної нервової системи і теж мають зв'язок із субарахноїдальним простором.

Ліквор необхідний для нормального функціонування мозкової тканини. Він є амортизатором для головного та спинного мозку, захищаючи його від механічних пошкоджень. Спинномозкова рідина бере участь у живленні, обмінних процесах у мозку та виведенні кінцевих продуктів метаболізму, підтримує стабільність водно-електролітного стану, має бактерицидні властивості.

Утворення, циркуляція та склад ліквору залежать не лише від стану центральної нервової системи, а й організму в цілому, тому дослідження його має важливе значення як для діагностики захворювань головного й спинного

мозку та їх оболонок, так і для вивчення патогенезу хвороб, що перебігають з ураженням нервової системи, прогнозування глибини патології та ефективності лікувальних заходів. Для клініцистів особливе значення має вивчення проникності патогенних продуктів та лікарських речовин через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) у лікворну систему і ефективність ендолюмбального введення лікарських препаратів з метою безпосередньої дії на патологічний процес у мозку.

Для одержання ліквору у ветеринарній медицині застосовують люмбальну, постокципітальну та субокципітальну пункції.

Люмбальну (люмбосакральну) пункцію проводять на стоячих або вимушено лежачих тваринах. Місце пункції знаходиться між останнім поперековим хребцем та переднім краєм крижової кістки. Тут пальпується еластична, ледь помітна “впадина”. Місце проколу знаходиться на перетині двох ліній: перша з'єднує медіальні кути маклаків, друга – проходить по остистих відростках хребців. Місце проколу вистригають і дезінфікують. Пункцію виконують спеціальною гол-кою з мандреном довжиною 80–150 мм і товщиною 1,2–1,8 мм. Перед пункцією роблять прокол або надріз шкіри. Потім голку з мандреном вводять у субарахноїдальний простір. При проведенні люмбальної пункції голка проколює шкіру, підшкірну клітковину, поперекові м'язи, міжхребцеву зв'язку і тверду оболонку спинного мозку, після проколювання якої відчувається “провалювання” голки в люмбальну цистерну. При правильному проколюванні після витягування мандрена спинномозкова рідина виділяється спонтанно струминно чи краплями або її відсмоктують за допомогою шприца. Для кращого витікання ліквору можна перетискати яремні вени, що сприяє підвищенню тиску в спинномозковому каналі. Відстань від шкіри до люмбальної цистерни становить у дорослої великої рогатої худоби 70–90 мм, у коней – 80–120 мм. При відповідних навиках люмбальну пункцію легко виконати, і після неї ускладнень у тварин не буває.

Субокципітальну (цистернальну) пункцію здійснюють лежачій на боці або стоячій у спеціальному станку тварині в положенні з надійно зафіксованою і зігнутою (під себе) головою. У собак, котів і молодняку свиней прокол краще робити при загальному наркозі. Місце пункції знаходиться в потиличній ямці між потиличною кісткою та атлантом. Точку проколу шукають на перетині двох ліній: першої, яка проходить по остистих відростках шийних хребців, та другої – перпендикулярної до неї, яка з'єднує краніальні кути атланта. Ці кути досить добре пальпуються у великої рогатої худоби та коней. Пункцію виконують спеціальною голкою з мандреном. Після підготовки місця проколюють зверху вниз шкіру, підшкірну клітковину, вийну зв'язку, м'язи, тверду та судинну оболонку мозку. Глибина до потиличної цистерни у великих тварин становить

65–85 мм. Про правильність проколювання свідчить виділення ліквору після витягування мандрена.

Постокципітальну (цervікальну) пункцію виконують здебільшого на лежачих тваринах з добре зафіксованою та максимально зігнутою центрально головою, подібно до субокципітальної, але переваги її полягають у тому, що голку вводять далі від життєво важливих органів (довгастий мозок, передні сегменти спинного мозку). Прокол роблять між першим (атлантом) і другим (епістрофеєм) шийними хребцями на місці перетину двох ліній – першої, проведеної по остистих відростках шийних хребців, та другої, яка з'єднує каудальні кути атланта (перпендикулярно). Глибина проколювання становить 60–90 мм.

Для лабораторних досліджень ліквор беруть фракціями у 3–4 пробірки загальною кількістю від 5 до 15 мл. До ліквору, який містить фібриноген, що буває при ураженнях ГЕБ, менінгітах, щоб запобігти зсіданню його, необхідно додавати антикоагулянт.

Фізичні властивості ліквору. Вимірювання лікворного тиску (рахіметрію) проводять спеціальними манометрами або лікворографами і виражають у міліметрах водяного стовпчика (мм. вод. ст.) чи одиницях Паскаля (кПа). Прилад для вимірювання тиску під'єднують до пункційної голки відразу після витягування мандрена, не допускаючи втрат ліквору. Рахіметрію здійснюють протягом 1–3 хв. У великих тварин (велика рогата худоба, коні) рахіметрію виконують і в стоячому положенні, при якому тиск дещо нижчий. Наприклад, у корів лікворний тиск, заміряний на лежачій тварині, становить 80–250 мм вод. ст., а в стоячому положенні тварини – до 150 мм вод. ст. Підвищення лікворного тиску спостерігається при менінгоенцефаліті, гідроцефалії, печінковій комі, отруєнні свинцем, абсцесах, набряках, менінгіті, енцефаліті, кістозному арахноїдиті, стресі, крововиливах у мозок (табл. 16). Зниження тиску спостерігається при закритих мозкових травмах, важкій дегідратації, гострих інфекціях та інтоксикаціях.

Колір. Ліквор, одержаний від здорових тварин, безбарвний. Перші порції його можуть незначно забарвлюватися у червоний колір через домішки крові, яка зникає в наступних фракціях. Яскраво-червоне забарвлення ліквору (еритроцитрагія) зустрічається при крововиливах у лікворну систему внаслідок розриву кровоносних судин. У подальшому це призводить до ксантохромії – фарбування ліквору в кавово-жовтий колір внаслідок перетворення гемоглобіну в білірубін, оксигемоглобін і метгемоглобін. Еритроцитрагія та ксантохромія спостерігаються при травмах, пухлинах, гіперемії мозку, сонячному ударі, менінгітах, менінгоенцефалітах, губчастоподібній енцефалопатії великої рогатої худоби. Жовтий відтінок ліквору буває при піроплазмозі, нуталіозі, лептоспірози,

печінковій комі, жовтяницях, губчастоподібній енцефалопатії великої рогатої худоби.

Прозорість. У здорових тварин спинномозкова рідина прозора. Помутніння ліквору спостерігають при значному збільшенні вмісту клітин (еритроцитів, лейкоцитів, мікроорганізмів) та загального білка в ньому. Це часто буває у хворих на менінгіт, менінгоенцефаліт. При гнійному менінгіті спинномозкова рідина стає мутною, а при туберкульозному менінгоенцефаліті – опалесцентною.

Консистенція. У здорових тварин ліквор має водянисту консистенцію. Желеподібна консистенція буває у випадку проникнення у лікворну систему через ГЕБ фібриногену, якого в нормі там немає. Це спостерігається при пошкодженні ГЕБ, гнійному та туберкульозному менінгітах.

Запах. Мозкова рідина, одержана від здорових тварин, не має запаху. При уремії ліквор може набувати запаху сечовини. Гнильний запах спостерігається при гнійному менінгоенцефаліті, що є несприятливим прогнозом.

Відносна щільність ліквору у тварин становить 1,004–1,008 кг/л. При ураженнях центральної нервової системи (менінгіт, гнійний менінгоенцефаліт, інфекційний енцефаломієліт коней), злоякісній катаральній гарячці, уремії, діабеті відносна щільність ліквору підвищується.

Хімічне дослідження ліквору. Білок. Визначення концентрації білка в лікворі проводять уніфікованою біуретовою реакцією. У лікворі міститься незначна кількість білка, тому рефрактометричний метод краще не застосовувати. Концентрація білка у спинномозковій рідині значно нижча, ніж у сироватці крові (табл. 17). Дослідження кількості білка в спинномозковій рідині має важливе діагностичне значення при патології мозку. Захворювання центральної нервової системи супроводжується підвищенням концентрації білка в лікворі (*гіперпротеїнарагія*). Залежно від величини збільшення судять про глибину патологічного процесу. Гіперпротеїнарагія пов'язана з посиленням проникнення білків крові через ГЕБ внаслідок його пошкодження, із зниженим виведенням білків із лікворної системи при порушенні циркуляції, надходженням його із клітин мозку при їх дистрофії та некрозі, підвищеному екстракоріодальному утворенні. Найвищу концентрацію білка в лікворі виявляють при менінгіті, менінгоенцефаліті, пухлинах у головному та спинному мозку, тромбозі синусів, особливо коли до порушення ліквородинаміки приєднується венозний застій і виникають сприятливі умови для проникнення альбумінів і глобулінів із судинного русла в лікворну систему. Підвищення концентрації білка в лікворі настає в основному за рахунок високодисперсних фракцій. У лікворології для встановлення порушення співвідношення між білковими фракціями в спинномозковій рідині (диспротеїнарагія) застосовують колоїдно-осадові проби: Панді, Нонне-Апельта, Вайнброхта, Ланге. Проба Панді

вказує на збільшення кількості білка в лікворі за рахунок усіх фракцій. Полягає вона в тому, що на годинникове скельце, яке ставлять на темне тло, наносять 10–15 крапель 10%-го розчину карболової кислоти, а потім додають 1 краплю спинномозкової рідини. За інтенсивністю помутніння ліквору при з'єднанні з насиченою карболовою кислотою судять про збільшення кількості білка в лікворі. Пробу Панді оцінюють за трибальною шкалою: (+) – слабо позитивна, (++) – позитивна, (+++) – сильно позитивна. Реакція є високочутливою при захворюваннях, які характеризуються гіперпротеїнарією та диспротеїнарією.

Реакція Нонне-Апельта виконується за допомогою розчину амонію сульфату. На межі зіткнення реактиву із спинномозковою рідиною утворюється білкове кільце. Після струшування чи змішування рідин одержують опалесценцію або помутніння різної інтенсивності. Тому реакцію Нонне-Апельта оцінюють за чотирибальною шкалою: (+) – слабо позитивна, коли опалесценція слабо помітна; (++) – помір-но позитивна, коли є незначне помутніння; (+++) – позитивна, при вираженому помутнінні; (++++) – різко позитивна, коли є інтенсивне помутніння.

Реакція Нонне-Апельта є показовою при збільшенні в лікворі глобулінів. Реакцію Вайнброхта виконують шляхом додавання до 7-ми частин спинномозкової рідини 3-х частин 0,1%-ного розчину срібла нітрату. Після струшування суміші може наставати різного ступеня помутніння, яке залежить від зростання кількості білка в лікворі. Збільшення кількості альбумінів у лікворі можна виявляти за допомогою індикаторних смужок, які використовують для визначення білка в сечі.

Гіпопротеїнарія та диспротеїнарія спостерігаються при бактеріальному менингоенцефаліті, лістеріозі, злоякісній катаральній гарячці, сепсисі, некрозі мозку, вірусному енцефаліті, отруєнні свинцем, печінковій комі, сонячному та тепловому ударах.

Залишковий азот. Підвищення концентрації сечовини та креатиніну в лікворі є показником ниркової недостатності та уремії. Концентрація аміаку в лікворі досить низька (у крові до 15 мкмоль/л). Зростання вмісту аміаку в лікворній системі – важлива патогномонічна ознака печінкової енцефалопатії та печінкової коми, що свідчить про значні порушення антитоксичної функції органа. Аміак токсичний для мозку, тому зростання його концентрації у спинномозковій рідині є несприятливим прогнозом.

Ензими. У лікворі виявлено близько 30 ензимів, які надходять сюди із тканини мозку, плазми крові та клітин самого ліквору. У здорових тварин ензими розміщені всередині нейронів і залишають їх лише в мінімальній кількості. Тому активність ензимів ліквору досить низька і становить: креатинкінази (КК) – 1–4 од/л, лужної фосфатази (ЛФ) – 1–6, аспарагінової та аланінової трансфераз – відповідно 0,0–8,0 і 0,0–5,0 од/л. Навіть при незначних ураженнях паренхіми

мозку настає елімінація ензимів у ліквор. Підвищення активності лікворних ензимів спостерігається при некрозі та травмах мозку, печінковій комі, менінгоенцефаліті, лістеріозі, вірусному енцефаліті.

Глюкозу в лікворі визначають тими ж методами, що і в плазмі крові. Кількість її складає 60–80% від концентрації у плазмі крові. Зниження концентрації глюкози в лікворі (гіпоглікорахія) є ознакою посиленого гліколізу, порушення транспорту через ГЕБ та підвищеного використання глюкози клітинами ліквору. Спостерігається вона при інфекційному менінгіті, менінгоенцефаліті, пухлинах (табл. 17), післяродовій гіпокальціємії, виснаженні (аліментарній дистрофії). Підвищення концентрації глюкози в лікворі (гіперглікорахія) виявляють при стресі, цукровому діабеті, лістеріозі та некрозі, травмі та ішемії мозку. Після введення інсуліну в організм рівень глюкози в лікворі стає вищим, ніж у крові.

Мікроскопічне дослідження ліквору. Мікроскопічне дослідження ліквору проводять з метою підрахунку кількості еритроцитів, лейкоцитів та виведення лейкограми. Підрахунок клітин у нативному лікворі необхідно проводити протягом 1 год після його взяття, оскільки пізніше вони розпадаються (цитоліз). При необхідності в ліквор додають розчин Тюрка або Самсона, завдяки якому еритроцити руйнуються, а лейкоцити консервуються і фарбуються. У лейкоцитарний меланжер набирають до позначки 1 розчин, а до позначки 11 – ліквор. Кількість клітин підраховують, використовуючи лічильну камеру із сіткою Фукс-Розенталя. Підрахунок ведуть по всій камері у великих квадратах. У лікворі клінічно здорових тварин міститься від 0 до 8×10^6 /л лейкоцитів. Еритроцити можуть бути лише в першій фракції ліквору. Збільшення кількості еритроцитів (еритроцитрахія) призводить до зміни кольору ліквору на кривавий. Збільшення кількості лейкоцитів у спинномозковій рідині (плеоцитоз) є наслідком ураження центральної нервової системи, і кількість їх перебуває у прямій залежності від глибини патологічного процесу. Плеоцитоз спостерігається при бактеріальному менінгіті, менінгоенцефаліті, вірусному енцефаліті, лістеріозі, некрозі та абсцесі мозку, печінковій комі.

Для диференціації лейкоцитів ліквор збагачують методом центрифугування або седиментації. Після цього роблять мазок, фіксують і фарбують його. Лейкограма ліквору складається в основному з клітин двох видів: лімфоцитів (60–80 %) та моноцитів (20–40 %), в поодиноких випадках виявляють нейтрофіли, еозинофіли, плазматичні клітини. Гострі запальні процеси у мозковій тканині призводять до збільшення кількості нейтрофілів, хронічні – нейтрофілів та моноцитів, паразитарні хвороби спричиняють збільшення кількості еозинофілів, а вірусні – лімфоцитів.

Бактеріологічне дослідження ліквору проводять з метою виявлення збудників захворювань: менінго-, пневмо-, стрепто- і стафілококів, лістерій, сальмонел, пастерел та ін. При посіві ліквору на спеціальні живильні середовища одержують чисті культури збудників, що викликають хвороби нервової системи. Для виявлення вірусів застосовують вірусологічне дослідження ліквору, імунофлюоресценцію, серологічні проби.

Імунологічні дослідження спинномозкової рідини застосовують для діагностики інфекційних захворювань, що перебігають з ураженням нервової системи. Для цього користуються імунобіологічними реакціями: імунодифузії, імуноелектрофорезу, імуноадсорбції.

Порушення обміну речовин при хворобах нирок (нефрити, нефроз, нефросклероз, сечокам'яна хвороба).

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–Боумана ($P_{капс}$), 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.: $ЕТФ = P_k - (P_b + P_{капс}) = 30$ 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. 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 ендогенний 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-Боумена, який стискає 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 злущеним 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 екстрауренального 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, кетонових тіл у підвищеній концентрації тощо). Всі ці зміни зумовлюють значні відхилення у властивостях і складі сечі.

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 °С 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 каналцева. Функціональна ниркова протеїнурія спостерігається у новонароджених тварин протягом перших 10-ти днів життя та в корів перед отеленням, характеризується короткочасним перебігом і не супроводжується клінічними симптомами. Протеїнурія 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 каналців (каналцева) 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 каналцях і характеризується зростаючим виділенням із сечею білків із малою молекулярною масою, які вільно проходять через стінку клубочків. Це – \square 2-макроглобулін, лізоцим, \square 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, уроцистолітазі. 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 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 канальцях 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 вміст 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).

Контрольні запитання

1. Назвіть функції ліквору.
2. Утворення, циркуляція та склад ліквору.
3. Методи одержання ліквору у ветеринарній медицині.
4. Які фізичні властивості ліквору?
5. Хімічне дослідження ліквору.
6. Мікроскопічне дослідження ліквору.
7. Поясніть процес утворення сечі.
8. Назвіть фактори, що впливають на величину фільтрації первинної.
9. Назвіть причини порушення концентрування сечі.
10. Назвіть зміни хімічного складу сечі.

ТЕМА 7. КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН

Анотація: У розділі розкрито причини утворення пухлин, основні характерні риси пухлин, відмінності пухлинної тканини від вихідної тканини, найважливіші біохімічні і фізіологічні особливості пухлинної клітини, показано багатокomпонентний вплив пухлин на організм

Ріст тканини – то дуже жорстко регулюємий процес. В багатоклітинних організмах с/г тварин виділяють три рівня цієї регуляції.

Координація розмноження клітин здійснюється:

- 1) нервовою системою регуляції;
- 2) гормональною системою регуляції;
- 3) тканинною системою регуляції.

Вплив цих систем регуляції реалізується через генний механізм регуляції поділу клітин. В свою чергу генна регуляція приводить до поділу клітин тільки тоді, коли в самій клітині забезпечено синтез нуклеїнових кислот, білків, процес подвоєння та розходження хромосом та багато інших процесів.

Порушення тканинного росту може бути обумовлено зміною або поломкою будь-якої ланки (звена) процесу розмноження клітини та його регуляції, що призводять до якісних та кількісних змін процесів росту. Найчастіше це пов'язано із змінами в центральному механізмі регуляції або у внутрішньоклітинному комплексі.

Система геномної регуляції ділення клітини при цьому може залишатися в своїй основі не порушеною. При порушенні ж генного механізму, регулюючого ділення клітини, ця клітина починає не адекватно відповідати на центральні та тканинні регуляторні впливи, що веде до порушення зворотного зв'язку з ефекторними клітинними механізмами. Клітинне ділення стає нерегульованим. Зміни в процесах росту тканини, що йдуть за такими механізмами порушень, являють собою пухлину.

Тобто, *пухлинний процес* – це патологічний процес, що являє собою нерегульований, необмежений ріст тканини, не пов'язаний з структурою ураженого органу та його функцією.

Пухлина з'являється в організмі у результаті перетворення нормальних клітин в пухлинні, у яких порушується регуляція процесів поділу, тобто зовсім відсутнє, або не достатньо ефективно пригнічення клітинного ділення, що обумовлює нестримне розмноження пухлинних клітин.

Пухлинна тканина характеризується необмеженим ростом. Цей процес закінчується тільки із смертю організму в цілому. У відокремленій культурі такої тканини ріст та поділ можна підтримувати нескінченно довго, що не характерно для нормальної тканини.

Здатність пухлинних клітин необмежено розмножуватися передається у спадок дочірнім клітинам, як домінуючий ознак соматичного успадкування і проявляється не тільки у організмі, а і у відокремленій культурі пухлинної тканини, а також при трансплантації пухлин.

Пухлина виростає “сама з себе”, тобто її збільшення проходить за рахунок розмноження, поділу навіть однієї єдиної пухлинної клітини. Сусідні нормальні клітини у цей процес не втягуються. Володіючи відносною автономністю, пухлина виходить з під контролю та регулюючого впливу систем організму, що здійснюють та підтримують гомеостаз.

Пухлинна тканина помітно відрізняється від вихідної тканини, з якої вона виникла, по структурі, фізико-хімічним, біохімічним та іншим властивостям. В основі біохімічних особливостей пухлинної тканини лежать зміни генетичної регуляції клітини. В результаті репресії одних генів припиняється синтез зв'язаних (співставлених) з ними ферментів, структурних білків та інших біомолекул. Депресія інших генів призводить до появи в клітині нових типів білків, ізоферментів. Як правило репресується вироблення ферментів та білків, що дозволяють клітині виконувати її спеціалізовані функції. А ось активуються шляхом депресії відповідних генів ті ферменти та біологічні сполуки, які забезпечують клітинне ділення.

Репресувати або депресувати ті чи інші гени в клітині мають змогу цілий ряд хімічних речовин, фізичних впливів, що мають об'єднувальну назву канцерогенів (тобто генеруючих канцер). Канцерогенні фактори потенційно здатні викликати не тільки злам регуляції клітинного ділення, а й порушити функції інших структурних та регуляторних генів. І тому в пухлинній клітині іноді спостерігається неочікувана депресія синтезу речовин, наприклад, гормонів, які в нормі не синтезуються даною тканиною. Так, при карциномі легенів, в них може розпочатися синтез кортикотропіну чи гонадотропіну, у пухлинах нирок – синтез тироксину. З цієї ж причини в пухлинах може втрачатися виробництво того або іншого ферменту, або початися синтез нового.

Однак характерним є те, що різні пухлини наближаються одна до одної по комплексу ферментів, що входять в їх склад. І цей комплекс тим менший, чим більшою є диференціація клітин пухлини.

Найважливішою біохімічною особливістю пухлинної клітини є активізація синтезу нуклеїнових кислот. В пухлинних клітинах, в порівнянні з нормальними, змінюється і набір, комплекс ДНК-полімераза. В пухлинах зменшується кількість

ДНК-полімераза, що використовують як матрицю нативну, неушкоджену ДНК, і збільшується кількість тих типів ДНК-полімераза, що здатні будувати ДНК по денатурованій матриці.

В пухлинних клітинах якісно та кількісно змінюється і синтез білків. До білків, синтез котрих в цих клітинах різко збільшується, відносяться протеїни мітотичного апарату, в тому числі і високомолекулярний білок веретена. В нормі концентрація білків мітотичного апарату в клітині складає десь до 11% від їх загальної кількості, тоді як в пухлинній клітині їх рівень сягає до 30%. Змінюється і метаболізм білків. Знижується здатність пухлинних клітин до переамінування та дезамінування амінокислот, іноді не синтезуються деякі ферменти, що приймають участь в обміні амінокислот.

У більшості пухлинних клітин *підвищується захват амінокислот з крові та синтез з них необхідних білків*. Катаболізм білку у пухлинних клітин знижується настільки, що навіть у голодуючих тварин білки пухлинних клітин не приймають участь у проміжному обміні. Більш того, методом ізотопних маркерів було встановлено, що коли нормальні клітини тканин голодуючого організму тварин віддають на енергетичні потреби свої амінокислоти, то пухлина перехоплює і “привласнює” їх собі. Все це й дозволило охарактеризувати пухлину, як «пастку» азоту. Зникнення в пухлинній тканині деяких ферментів може спричинити до втрати здатності синтезу деяких незамінних амінокислот, наприклад L – аспарагіну.

Особливе місце в біохімії пухлин займає вивчення обміну вуглеводів та виробництво енергії. В пухлинах часто значно збільшується швидкість гліколізу. Інтенсивний гліколіз не є специфічною здатністю тільки пухлин. Однак при порівнянні активності ферментів гліколізу в пухлині і вихідній тканині, то спостерігається помітне збільшення активності основних ферментів гліколізу, таких як гексокіназа, фосфофруктокінази і піруваткінази. В пухлинних клітинах проходить аеробний гліколіз, тобто розклад вуглеводів до пірувата і перетворенні його в молочну кислоту. В той же час в більшості нормальних тканин спостерігається гальмування перетворенні пірувату до молочної кислоти в присутності кисню і зниження інтенсивності гліколізу. У свій час була висунута теорія, що інтерпретувала ці факти як причину злоякісної трансформації клітин. Тобто під дією деяких факторів, що перешкоджали одержанню клітинами енергії від окислення, останні були змушені переходити до гліколізу, що й спричиняло злоякісну трансформацію клітини. Однак сучасна точка зору розглядає усі ці особливості не як причину виникнення пухлин, а як результат дуже складної перебудови комплексу ферментів під дією канцерогенних факторів.

Пухлина дуже інтенсивно захоплює із крові глюкозу. Навіть при підвищеній до 300 мг% концентрації глюкози в крові тварини (норма для ВРХ – 51 мг%) відтікаюча з пухлини кров не містила в собі глюкози. Цю здатність пухлини пов'язують зі зміною активності трансфераз гексоз. Енергія, яку отримують пухлинних клітини від гліколізу достатня для забезпечення активного синтезу нуклеїнових кислот і досягнення основної мети – клітинного ділення.

В пухлинах також проходять зміни окислення (тобто тканинного дихання). В основному спостерігається тенденція до зниження дихання пропорційно ступеню дедиференціювання клітин. При цьому відбувається пригнічення окислення при глюкозному навантаженні, що можна пояснити як результат конкурентної боротьби могутньої гліколітичної системи ферментів пухлини з досить слабкими окислюючими ферментами за неорганічний фосфор, коферменти та інші складові та субстрати. Інтенсивний гліколіз призводить до накопичення молочної кислоти. При навантаженні вуглеводами рН пухлинної тканини може знижуватись до 6,4.

В пухлинні підвищена концентрація води, а іноді і деяких електролітів, зокрема солей К. Рівень Са і Mg знижений, а співвідношення К – Са збільшено. За рахунок гідратації і підвищення кількості іонів водню (H), а також деяких електролітів, електропровідність пухлинної тканини підвищена. У пухлинних клітин завжди спостерігається підвищена кількість на зовнішній мембрані електровід'ємних радикалів нейрамінової кислоти, що спричиняє до підвищення від'ємного заряду цих клітин.

Характерною рисою пухлинних тканин є часткове або повне пригнічення функцій, що виконувались клітинами до дедиференціювання. Наприклад, при гепатомі зупиняється синтез жовчних пігментів. або ж ці тканини втрачають контроль над синтезом специфічних для них сполук. Так, пухлинні клітини мозкової тканини наднирників починають неконтрольований синтез і викид у кров адреналіну.

Злоякісність пухлин характеризується здатністю пухлинних тканин до інфільтративного типу росту (тобто проникаючого, проростаючого), та здатністю до метастазів. Ця здатність пов'язана з порушенням у пухлинної тканини міжкліткових взаємодій і взаєморегуляції. В пухлинах спостерігається зниження контактного гальмування. Коли в виділеній культурі розмножуються клітини нормальної тканини, то клітини двох сусідніх ділянок, ділячись по фронту росту, приходять до контакту одна з одною, і ріст та ділення клітин на лінії доторку клітин призупиняється. Тобто, клітини, при доторкуванні як би виключають процес подальшого ділення одна у одної. Клітини ж пухлини, незважаючи на наявність такого контакту, продовжували ділитись, утворюючи багаточисельні накопичення.

Є декілька досліджених моментів, що дозволяють пояснити здатність злоякісних пухлин до інфільтрації:

1) Втрата механізму контактного гальмування ділення та росту клітин за рахунок значного зменшення між мембранами пухлинних клітин щілиновидних контактів. Через ці контакти нормальні клітини обмінюються прямо з цитоплазми в цитоплазму низькомолекулярними (до 2000 дальтон) сполуками – регуляторами, інгібіторами ділення. Такий обмін, певно, і є важливою частиною механізму контактного гальмування.

2) В зовнішніх мембранах пухлинних клітин виявлені вмонтовані протеолітичні ферменти – катепсина, які здібні порушувати мембрани, та контакти між собою нормальних клітин, і тим самим сприяти вrostанню пухлинних клітин між нормальними. З другого боку ці катепсина зменшують ймовірність утворення контактів між пухлинними клітинами, і цим самим стимулюють клітинне ділення в пухлинах.

3) В міжклітинній рідині пухлинної тканини виявлені у вільному стані 4 види протеолітичних ферментів лізосомального походження, які в свою чергу змінюють структури мембран нормальних та пухлинних клітин, порушують нормальні міжклітинні контакти і сприяють інфільтративному росту та метастазуванню.

4) В зовнішніх мембранах пухлинних клітин, на відміну від нормальних, дуже багато відкритих радикалів нейрамінової кислоти, глікопротеїдів та інших сполук, що перешкоджає утворенню тісного контакту між пухлинними клітинами.

Вплив пухлин на організм є багатокomпонентним. Крім прямого ураження та пошкодження тих чи інших органів, що призводить до унеможливлення їх повноцінного функціонування, є й інші шляхи впливу злоякісних пухлин на організм:

– отруєння токсичними речовинами, що їх продукує при своєму невтримному рості пухлина;

– глибоке виснаження організму, у якого пухлина активно відбирає поживні речовини та енергію;

– із пухлини до організму потрапляє велика кількість недоокислених продуктів, які не будучи самі по собі вельми токсичними, порушують обмін та токсикують нормальні органи.

Відомо, що пухлина, наприклад, синтезує і виділяє високоактивний поліпептид, що отримав назву токсогомон. Цей білок спричиняє зниження рівню ферменту каталази в печінці та нирках, заліза в крові. Ці зміни тягнуть за собою виникнення анемії, пригнічення еритропоезу, гіпертрофію надниркових залоз, збільшення селезінки та печінки. Частина ферментів пухлин переходить в

організм завдяки проникливості пухлинної рідини, а також частковому некрозу пухлинної тканини. При цьому у крові і інших рідинах організму з'являються і пухлинні білки, в тому числі і синтезовані пухлиною ембріональні білки. Так, рівень лужної фосфатази при остеогенній саркомі підвищується в 20-40 разів, а підвищення рівня кислої фосфатази – при пухлинах передміхурової залози. При різних пухлинах підвищується рівень в крові альдолази, деяких ізоформ лактатдегідрогенази, знижується активність холінестерази та рибонуклеази. Слід зазначити, що характер змін активності ферментів в крові хворих тварин не завжди специфічні тому чи іншому виду пухлини. Дуже великі зміни спостерігаються в організмі при розвитку пухлин, в яких відбувається неконтрольований синтез гормонів та інших біологічно активних речовин.

Діагностичну цінність при лабораторних дослідженнях мають лише визначення появи тих біохімічних сполук, які зовсім нехарактерні, зовсім відсутні за нормальних умов в організмі.

Так, поява в крові дорослих тварин фетального -фетопротеїну свідчить про появу неопластичних процесів в печінці, тобто про гепатому, ще до появи клінічних симптомів цієї хвороби.

Контрольні запитання

1. Як здійснюється координація розмноження клітин?
2. Дайте визначення пухлинному процесу.
3. Яка найважливіша біохімічною особливістю пухлинної клітини?
4. Які особливості обміну вуглеводів та виробництво енергії в пухлинній клітині?
5. Як пояснити здатність злоякісних пухлин до інфільтрації?
6. Перерахуйте вплив пухлин на організм.

Список використаних джерел

1. Ветеринарна клінічна біохімія / Левченко В. І., Влізло В. В., Кондрахін І. П. та ін.; за ред. В. І. Левченка і В. Л. Галяса. Біла Церква: БДАУ, 2002. 400 с.
2. Ветеринарна клінічна біохімія: навч. посіб. / Мельничук Д. О., Грищенко В. А., Томчук В. А. та ін.; за ред. Д. О. Мельничука. 2-е вид. перероб і доп. Київ: НУБіП України, 2014. 456 с.
3. Клінічна біохімія (Підручник) / За ред. проф. Склярова О.Я. – К.: Медицина, 2006. 432 с.
4. Клінічна біохімія: навч. посібник / За ред. О.П.Тимошенко. – К.: ВД «Професіонал», 2005. 288 с.
5. Клиническая биохимия / Цыганенко А.Я., Жуков В.І., Леонов В.В., Мясоедов В.В., Завгородний И.В. – Х.: Факт, 2005. 456 с.
6. Губський Ю.І. Біологічна хімія. Київ-Вінниця: Нова Книга, 2009. 664 с.
7. Русак В.С., Чала І.В. Клінічна оцінка біохімічних, морфологічних показників крові та сечі тварин: Навчальний посібник. Житомир: «Полісся», 2016. 544с.