

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
Національної поліції України

Методичні рекомендації
до лабораторних занять з дисципліни «Ветеринарна клінічна біохімія» для
здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти за
спеціальністю Н 6 (211) «Ветеринарна медицина», галузі знань Н «Сільське,
лісове, рибне господарство та ветеринарна медицина». Тема:
«Ензимодіагностика». Змістовний модуль 2.



м. Кам'янець – Подільський
2026 р.

УДК 619:616-07(075)

Укладач:

Тетяна ТОКАРЧУК, кандидатка сільськогосподарських наук, доцентка кафедри гігієни тварин і ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України

*Рекомендовано до друку науково – методичною радою Закладу вищої освіти
«Подільський державний університет»
(протокол № 2 від 25.03.2026 р.)*

Рецензенти:

Анатолій ЛАВСЬКИЙ Начальник Кам'янець-Подільського районного управління Головного управління Держпродспоживслужби в Хмельницькій області

Юлія ЄВСТАФІЄВА кандидатка с.- г. наук, доцентка кафедри технології виробництва і переробки продукції тваринництва

Методичні рекомендації до лабораторних занять з дисципліни «Ветеринарна клінічна біохімія» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю Н 6 (211) «Ветеринарна медицина», галузі знань Н «Сільське, лісове, рибне господарство та ветеринарна медицина». Тема: «Ензимодіагностика». Змістовний модуль 2 / Тетяна ТОКАРЧУК, Кам'янець – Подільський: ЗВО «ПДУ», 2026. 34 с.

Методичні рекомендації розроблені аби допомогти при вивченні навчальної дисципліни здобувачами підчас проходження лекційного матеріалу і лабораторних занять. Містять передмову, перелік питань до теми, які виносяться на опрацювання, що представляють основу методичних рекомендацій, перелік запитань для самоконтролю, тестові завдання та список використаної і рекомендованої літератури.

© ЗВО «ПДУ», 2026

ЗМІСТ

1.	Передмова	4
2.	<i>Лабораторне заняття. Тема:</i> Одиниці активності ферментів, методи їх визначення	5
3.	<i>Теоретичні відомості:</i> Виділення та очищення ферментів	5
3.1.	Множинні молекулярні форми ферментів. Ізоферменти	10
3.2.	Поліферментні системи	13
3.3.	Імобілізовані ферменти та їх застосування	15
3.4.	Значення ферментів для ветеринарії	18
4.	<i>Завдання 1.</i> Визначення активності амілази (діастази) сечі за методом Вольгемута	26
5.	<i>Завдання 2.</i> Визначення активності холінестерази в сироватці крові	28
6.	Тестові завдання	30
7.	Питання для самоконтролю	33
8.	Використана і рекомендована література	34

Передмова

Ферменти є фундаментальними біокаталізаторами, що забезпечують життєдіяльність організму на молекулярному рівні. Вони присутні в усіх біологічних структурах і відіграють ключову роль не лише у природному обміні речовин, а й у метаболізмі лікарських засобів.

Сучасний етап розвитку біохімії та ветеринарної медицини вимагає від фахівця вільного володіння методами ензимодіагностики. Глибоке розуміння механізмів регуляції ферментативної активності є необхідним як для розробки новітніх біотехнологічних препаратів, так і для ефективного застосування ензимотерапії в клінічній практиці. Дані рекомендації спрямовані на вивчення факторів впливу на швидкість реакцій, опанування методики розрахунку активності ферментів у одиницях СІ та формування цілісного уявлення про пріоритетні напрями сучасної ензимології.

Лабораторне заняття. Тема: Одиниці активності ферментів, методи їх визначення

Мета: навчитися проводити кількісну оцінку активності ферментів у біологічних рідинах тварин (сечі та сироватці крові) для оцінки функціонального стану внутрішніх органів та діагностики патологій.

Теоретичні відомості:

Виділення та очищення ферментів

Оцінка активності ферментів при їх виділенні базується на двох ключових показниках:

- **Міжнародна одиниця (МО):** кількість ферменту, що забезпечує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв (на 1 г тканини) за стандартних умов.
- **Питома активність:** кількість одиниць активності, розрахована на 1 мг загального білка в зразку.

Практичне значення: Питома активність є індикатором ступеня очистки. Чим вищий цей показник, тим якісніше проведено виділення ферменту від баластних білків.

Міжнародна біохімічна спілка запропонувала використати як одиницю активності *катал* (кат). Активність в 1 кат – це така кількість каталізатора, яка перетворює 1 моль субстрату на продукт за 1 секунду. Отже, 1 кат = 60×10^6 міжнародних одиниць. Рекомендовано використати також одиницю значно меншого масштабу - нанокатал (нкат), яка дорівнює 10^9 кат.

Кількість молекул субстрату, які перетворюються однією молекулою ферменту на продукт у процесі реакції за одиницю часу при повному насиченні ферменту субстратом, прийнято називати *числом обертів ферменту*, або *молярною активністю*. Ця активність виражається в каталах на 1 моль ферменту.

Методи визначення активності ферментів у біологічних об'єктах

Здебільшого кількість фермента не можна виміряти в одиницях маси, тобто в міліграмах або в моль, про неї опосередковано свідчить його

активність, тобто дія фермента. Іншими словами, присутність і кількість фермента виявляють за специфічністю та швидкістю реакції, яку він каталізує. Активність фермента можна визначити опосередковано: за визначенням кількості продукту, який утворився під дією ферменту або за кількістю витраченого субстрату за одиницю часу при оптимальних умовах ферментативної реакції. Наприклад, активність α -амілази, яка каталізує гідролітичне розщеплення крохмалю з утворенням у кінцевому результаті мальтози, розраховують на основі кількості негідролізованого крохмалю або за кількістю утвореної мальтози.

Найчастіше активність ферментів визначають у сироватці, плазмі або клітинах крові та в сечі колориметричними, спектрофотометричними, флюориметричними, манометричними, кондуктометричними, віскозиметричними методами. У клініко-діагностичних лабораторіях для визначення активності ферментів переважно застосовують колориметричні та спектрофотометричні методи.

В основі *колориметричних методів* лежить вимірювання інтенсивності забарвлення розчину за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК). Забарвлена сполука утворюється в результаті взаємодії продукту (або субстрату) ферментативної реакції зі специфічними реагентами, які додають у середовище після зупинки ферментативного процесу.

Типовим прикладом є визначення активності **лактатдегідрогенази (ЛДГ)**. У ході прямої реакції накопичується піруват, який у лужному середовищі реагує з 2,4-динітрофенілгідразином. Отриманий забарвлений гідразон дозволяє кількісно оцінити вміст пірувату: чим вища інтенсивність кольору, тим вищою є активність досліджуваного ферменту.

Спектрофотометричні методи реєструють поглинання світла в певних ділянках спектра коферментами, субстратами або продуктами реакції. Ці методи широко застосовують для визначення активності оксидоредуктаз, зокрема НАД⁺- та НАДФ⁺-залежних дегідрогеназ. Перехід НАД⁺ або

НАДФ₊ з окисненої форми у відновлену супроводжується зміною поглинання в ультрафіолетовій ділянці спектра. В окисненій формі кофермент дає одну вузьку смугу поглинання при $\lambda=260$ нм, яка обумовлена наявністю аденіну в його молекулі.

У разі відновлення кофермента поглинання світла в цій зоні дещо знижується, але з'являється інша широка смуга поглинання при $\lambda=340$ нм. Поява цієї смуги зумовлена зникненням одного подвійного зв'язку у піридиновому кільці аденіну під час його відновлення. Визначення активності ферментів за різницею спектрів поглинання окисненої та відновленої форм НАД₊ (або НАДФ₊) та НАДН (або НАДФН) називають тестом Варбурга.

Використання високоочищених ферментних препаратів є необхідною умовою для вивчення кінетики реакцій, структури активних центрів та механізмів регуляції метаболізму. Основним завданням очищення є відокремлення цільового білка від клітинного екстракту та сотень подібних за властивостями макромолекул.

Основні етапи та методи очищення:

- **Видалення низькомолекулярних домішок:** здійснюється шляхом діалізу або гель-фільтрації.
- **Осадження нуклеїнових кислот:** за допомогою специфічних агентів (наприклад, антибіотиків).
- **Фракціонування білків:** використання висолювання (сульфатами амонію чи натрію), осадження органічними розчинниками (етанол, ацетон) або диференційної денатурації (зміна pH , нагрівання).
- **Розділення за фізико-хімічними властивостями:**
 - *За масою та розміром:* диференційне центрифугування, гель-хроматографія на молекулярних ситах (сефадекс).
 - *За зарядом:* іонообмінна хроматографія на целюлозних носіях (DEAE-целюлоза, CM-целюлоза) та електрофорез.

Афінна хроматографія виділяється як найефективніший метод селективного очищення. Вона базується на специфічній спорідненості ферменту до іммобілізованого ліганда. Після зв'язування цільового білка його елюють («знімають» з носія) за допомогою концентрованих сольових розчинів або вільного ліганда. Оскільки ферменти проявляють високу специфічність до своїх субстратів і коферментів, тому в якості лігандів найчастіше використовують похідні субстратів і коферментів, ковалентно зв'язаних з носієм, наприклад, сефадексом. Прикладом успішного використання афінної хроматографії може служити очищення великої кількості дегідрогеназ.

З афінною хроматографією схожа хроматографія з використанням у якості лігандів барвників (блакитна, зелена або червона сефароза), а також хроматографія на гідрофобних лігандах із використанням у якості носія фенол- або октилсефарози.

Локалізацію фермента в тканині чи клітині часто вдається ідентифікувати *in situ* гістохімічними методами (гістоензимологія). Розподіл ферментів у субклітинних органелах вивчають після попереднього фракціонування клітинних гомогенатів шляхом високошвидкісного центрифугування, визначаючи вміст ферментів у кожній фракції.

Локалізація деяких ферментів у клітині

Локалізація окремих ферментів в середині клітини (за О.П. Тимошенко)

Цитозоль	Мітохондрії	Лізосоми
Ферменти гліколізу	Піруватдегідрогеназний комплекс	Кисла фосфатаза
Ферменти пептидного циклу	Цитратсинтаза	β – Глюкуронідаза
Ферменти активації амінокислот	Ізоцитратсинтаза (НАД-залежна)	α – Глікозидаза
Мультиферментний комплекс синтетази жирних кислот	Металдегідрогеназа та інші ферменти циклу Кребса	β – Глікозидаза
АсАТ	Ацил-КоА-дегідрогеназа та інші	Катепсини
АлАТ		Кисла рибонуклеаза
Металдегідрогеназа		Кисла дезоксирибонуклеаза
Креатинфосфокіназа		А – Галактозидаза
Ізоцитратдегідрогеназа (НАДФ-)		Лізоцим

залежна) Глікогенфосфорилаза*	ферменти циклу окислення жирних кислот Креатинфосфокіназа Глутаматдегідрогеназа Ферменти дихального ланцюга та окисного фосфорилування АсАТ	Гіалуронідаза Алирсульфатаза Колагеназа
Глікогенсинтетаза Фосфоенолпіруваткарбоккіназа		

Мікросомальна фракція	Плазматична мембрана	Ядро
Глюкозо-6-фосфатаза Рибосомальні ферменти білкового синтезу Ферменти, що беруть участь у реакціях гідроксилювання Ферменти синтезу фосфоліпідів, триацилгліцеролів, а також ряд ферментів – учасників синтезу холестеролу	Аденілатциклаза Лужна фосфатаза Na ⁺ , K ⁺ - залежна АТФ-аза	Ферменти, що беруть участь в реплікації ДНК РНК-полімераза НАД-синтетаза

* ферменти синтезу і розчеплення глікогену, зв'язані з гранулами цього полісахариду.

Для цього спочатку руйнують клітинну структуру за допомогою відповідного дезінтегратора, утворена гомогенізована маса підлягає диференційному центрифугуванню при температурі 0-4 0°C. Центрифугування різними швидкостями гомогенатів різних тканин забезпечує седиментацію (осідання) субклітинних структур, що дозволяє згодом дослідити їх склад.

Якщо говорити про вузькоспеціалізовані клітини, то ферментів, які забезпечують їх функціонування в цих клітинах знаходиться більше порівняно з іншими. Наприклад, у клітинах міокарда підвищена кількість креатинкінази та

аспартатамінотрансферази, у гепатоцитах – аланінамінотрансферази, в остеобластах – лужної фосфатази тощо.

3.1. Множинні молекулярні форми ферментів. Ізоферменти

Ізоферменти (ізоензими) — це структурно подібні форми одного і того ж ферменту, які каталізують ідентичну біохімічну реакцію, проте відрізняються за своєю первинною структурою, фізико-хімічними властивостями (молекулярною масою, зарядом, термостабільністю) та спорідненістю до субстрату.

Генетична та структурна основа гетерогенності

Поява ізоферментів у живому організмі не є випадковою. Вона зумовлена наявністю декількох генетичних локусів або алельних варіантів генів. Більшість ізоферментів мають **олігомерну структуру**, тобто складаються з кількох поліпептидних субодиниць.

- Якщо фермент є димером (2 субодиниці) або тетрамером (4 субодиниці), комбінація різних типів ланцюгів (наприклад, типу \$A\$ та \$B\$) створює цілу серію ізоформ.
- Властивості кожного конкретного ізоферменту визначаються саме тими субодиницями, що входять до його складу. Наприклад, субодиниці одного типу можуть забезпечувати стійкість до високих температур, тоді як інші — високу чутливість до інгібіторів.

Органоспецифічність та електрофоретична рухливість

Найважливішою характеристикою ізоферментів є їхній **диференційований розподіл** у тканинах та органах. Кожен орган характеризується специфічним "спектром" або кількісним співвідношенням певної ізоформи.

Оскільки поліпептидні ланцюги мають різний амінокислотний склад, вони несуть неоднаковий сумарний електричний заряд. Це створює підґрунтя для їхнього розділення в електричному полі — методу **електрофорезу**. Під час електрофорезу суміш ізоферментів фракціонується на окремі зони (смуги), що дозволяє ідентифікувати, який саме орган зазнав ураження.

Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) як класичний приклад

На сьогодні науці відомо понад 100 ферментних систем, що мають ізоформи, але найбільш вивченою є **лактатдегідрогеназа (ЛДГ)**. Цей фермент бере участь у вуглеводному обміні, каталізуючи взаємоперетворення пірувату та лактату.

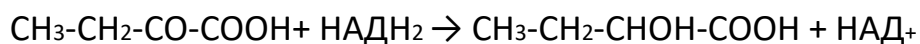
Молекула ЛДГ є тетрамером і складається з субодиниць двох типів: **Н** (*heart* — серцева) та **М** (*muscle* — м'язова). Їхня комбінація утворює 5 ізоферментів:

1. **ЛДГ-1 (Н_4)**: переважає в міокарді та нирках.
2. **ЛДГ-2 (Н_3М_1)**: міститься переважно в еритроцитах та лейкоцитах.
3. **ЛДГ-3 (Н_2М_2)**: характерна для легень, селезінки та підшлункової залози.
4. **ЛДГ-4 (Н_1М_3)**: присутня в печінці та скелетних м'язах.
5. **ЛДГ-5 (М_4)**: домінує в скелетній мускулатурі та печінці.

Клініко-діагностичне значення

Для фахівця ветеринарної медицини аналіз ізоферментного спектра є незамінним інструментом. Оскільки в нормі в сироватці крові спостерігається певне співвідношення ізоформ, будь-яке різке відхилення (наприклад, значне зростання ЛДГ-1) чітко вказує на руйнування клітин конкретного органу (у даному разі — міокарда), навіть якщо загальна активність ЛДГ залишається в межах норми.

Субодиниці ЛДГ відрізняються за спорідненістю до субстратів. Субодиниця „М” краще каталізує перетворення пірвіноградної кислоти до молочної. Субодиниця „Н” є менш специфічною за своєю дією та каталізує взаємоперетворення -кет- та -гідроксималярної кислоти в реакції:



Це дозволяє відрізнити ізоферменти, які складаються, основним чином, з субодиниць „Н” (ЛДГ₁, ЛДГ₂) від ізофермента, побудованого з „М”-субодиниць (ЛДГ₅) на підставі дослідження їх активності в реакції, яка визначається як реакція дегідрогенази -гідроксималярної кислоти та відбувається за участі ЛДГ₁.

Вивчення ізоферментного спектра широко використовується в клініці для діагностики органічних і функціональних уражень органів і тканин, встановлення чіткої локалізації патологічного процесу. Так, розподіл ізоферментів ЛДГ у сироватці крові за умов норми має наступний вигляд: ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅. При інфаркті міокарда ЛДГ₁ > ЛДГ₂ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅ - помітна характерна зміна „розташування” ЛДГ₁ та ЛДГ₂: активність ЛДГ₁ переважає над активністю ЛДГ₂. При гемолітичній анемії ЛДГ₂ + ЛДГ₁ > ЛДГ₃ + ЛДГ₄ + ЛДГ₅, загальна активність ЛДГ при цьому в 2 – 5 разів перевищує норму. При мегалобластних анеміях активність перевищує норму в 10 – 50 разів. Для захворювань м’язів, печінки, утворення пухлин розподіл ізоформ має наступний вигляд: ЛДГ₄ = ЛДГ₅ > ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃.

Крім ізоферментів лактатдегідрогенази велике клінічне значення мають ізоферменти креатинфосфокінази (КК), яка каталізує реакцію утворення креатинфосфату. Цей фермент є димером і побудований з двох основних субодиниць – В та М, з них утворюються три комбінації цих субодиниць і, як наслідок, три ізоферменти КК. У мозку переважає ізоформа ВВ, у скелетних м’язах – ММ, а у серцевому м’язі – ВМ.

3.2. Поліферментні системи

Організація та функціонування поліферментних систем

Більшість ферментів у живих організмах мають складну **четвертинну структуру**. Вони є олігомерами, побудованими з двох або більше білкових субодиниць (протомерів). Кількість цих компонентів варіюється залежно від специфіки ферменту: наприклад, **алкогольдегідрогеназа** складається з двох протомерів, **піруваткіназа** — з чотирьох, а **аспартаткарбамоїлтрансфераза** має складну архітектуру з шести каталітичних та шести регуляторних субодиниць. Ці білкові частини можуть бути як ідентичними, так і відрізнятися за своєю природою та роллю в каталізі.

У клітині ферменти не працюють ізольовано. Вони об'єднуються у **поліферментні (мультиферментні) комплекси**, де кожен учасник відповідає за певний етап у ланцюгу послідовних біохімічних перетворень. Залежно від способу взаємодії компонентів, виділяють три основні типи організації таких систем.

Функціональна організація

Цей тип базується на динамічному зв'язку через продукти реакцій. Окремі ферменти системи фізично не з'єднані між собою, а існують у розчиненому стані (наприклад, у цитозолі).

- **Механізм:** Продукт, утворений першим ферментом, дифундує в середовищі та стає субстратом для наступного ферменту. Послідовність реакцій визначається виключно спорідненістю кожного ферменту до конкретного метаболіту.
- **Приклад:** Процес **гліколізу** (розщеплення глюкози). Тут всі ферменти працюють як єдиний ланцюг завдяки метаболітам-посередникам.

- **Глобальна роль:** Метаболіти можуть бути спільними для різних шляхів, виконуючи роль «містків» між різними органелами та поєднуючи розрізнені реакції в єдину глобальну метаболічну карту клітини.

Структурно-функціональна організація

Тут ферменти об'єднуються у міцні надмолекулярні структури завдяки безпосереднім білок-білковим взаємодіям. Такі утворення часто називають **ферментними ансамблями**.

- **Характеристики:** Комплекси відрізняються високою стабільністю, їх важко розділити на окремі компоненти без втрати активності. Вони зазвичай жорстко закріплені на клітинних структурах (мембранах, рибосомах, мітохондріях).
- **Приклади:**
 - **Піруватдегідрогеназний комплекс:** об'єднує кілька ферментів для окиснення пірувату.
 - **Синтетаза жирних кислот:** складається з семи структурно пов'язаних елементів.
 - **Дихальний ланцюг:** система ферментів у мембранах мітохондрій, що забезпечує тканинне дихання шляхом перенесення електронів.

Змішаний тип організації

Це комбінована модель, де в межах одного метаболічного шляху співіснують обидва принципи взаємодії. Деякі ланки системи утворюють жорсткий структурний блок, тоді як інші взаємодіють лише через дифузію метаболітів.

- **Приклад: Цикл Кребса (цикл трикарбонових кислот).** У ньому частина реакцій каталізується структурно об'єднаним α -кетоглутаратдегідрогеназним комплексом, а решта ферментів функціонують як окремі одиниці, пов'язані потоком спільних субстратів.

3.3. Імобілізовані ферменти та їх застосування

Природа та застосування

Імобілізація — це процес штучного прикріплення молекул ферменту до нерозчинної у воді органічної або неорганічної матриці (носія). Як носії використовують білки (кератин, міозин, альбумін), ліпіди (холестерин, фосфатидилхолін) або синтетичні полімери.

Основні методи імобілізації

1. **Фізична адсорбція:** закріплення ферменту на поверхні нерозчинних матеріалів (скло, силікагель, целюлоза, хітин, декстрини).
2. **Включення в гель:** "заточення" молекул у пористу структуру гелю.
3. **Ковалентне зв'язування:** створення міцних хімічних зв'язків між ферментом і матрицею або між самими молекулами ферментів (утворення мультиферментних комплексів).

Переваги технології

- **Технологічність:** можливість проведення безперервних процесів (пропускання субстрату через колонку з ферментом).
- **Легкість очищення:** продукт реакції легко відділяється від ферменту, який залишається на носії.
- **Стабільність:** підвищується стійкість до температур та хімічних чинників. У випадку протеаз це запобігає **автолізу** (самоперетравленню).
- **Економічність:** можливість багаторазового використання біокатализатора.

Практичне застосування в промисловості

1. Виробництво глюкозо-фруктозного сиропу

Це багатоетапний процес перетворення кукурудзяного крохмалю, що базується на трьох іммобілізованих ферментах:

- **alpha-амілаза:** розщеплює крохмаль до коротких олігосахаридів.
- **Амілоглікозидаза:** гідролізує олігосахариди до чистої глюкози.
- **Глюкозоізомераза:** перетворює частину глюкози на фруктозу, створюючи солодкий сироп для кондитерської галузі.

2. Фармацевтичне виробництво антибіотиків

За допомогою іммобілізованої **пеніцилінамідинази** з природного пеніциліну отримують **б-амінопеніцилінову кислоту**. Вона є базовою сировиною для створення нових напівсинтетичних пеніцилінів, здатних боротися зі стійкими штамми мікроорганізмів.

Застосування у медицині та фармації

Використання іммобілізованих форм ліків часто ефективніше за розчинні препарати завдяки їхній стійкості та пролонгованій дії.

- **Хірургія та комбустіологія:** Іммобілізація протеаз на целюлозних носіях дозволяє створювати активні пов'язки та тампони. Вони поступово очищують рани та виразки від некротичних тканин, прискорюючи загоєння.
- **Кардіологія (тромболізис):** Препарат **Стрептодеказа** (стрептокіназа на полісахаридній матриці) забезпечує розчинення тромбів протягом 48–72 годин. На відміну від звичайної стрептокінази, яка швидко розпадається в крові, цей препарат має тривалий (пролонгований) ефект.

Застосування іммобілізованих ферментів у ветеринарії є перспективним напрямом, оскільки дозволяє вирішувати специфічні проблеми лікування тварин: від складності регулярного введення ліків до необхідності обробки великих ранових поверхонь.

Основні сфери їх використання:

1. Хірургія та лікування важких ран

Як і в гуманній медицині, у ветеринарії широко використовують **імобілізовані протеази** (трипсин, хімотрипсин, терилітин).

- **Форма випуску:** Ферменти закріплюють на текстильних носіях (серветки, бинти) або на порошкоподібних сорбентах.
- **Ефект:** Вони забезпечують поступове очищення ран від гною та некротичних (мертвих) тканин, не пошкоджуючи живі клітини. Це особливо актуально при лікуванні маститів у корів, трофічних виразок та важких післяопераційних ускладнень у домашніх тварин.

2. Створення пролонгованих препаратів

Тварини часто перебувають у стресі під час медичних маніпуляцій, тому мінімізація кількості ін'єкцій є критичною.

- **Механізм:** Ферменти, імобілізовані на водорозчинних полімерах (наприклад, поліетиленоксиді), знаходяться в кровотоці значно довше.
- **Приклад:** Використання аналогів стрептодекази для лікування тромбозів або спайкових процесів. Одне введення такого препарату замінює 5–10 ін'єкцій звичайного ферменту.

3. Ветеринарна діагностика (ІФА)

Одним із найважливіших напрямків є використання імобілізованих ферментів у тест-системах для діагностики інфекційних та паразитарних захворювань.

- **Імуноферментний аналіз (ІФА):** Фермент (наприклад, пероксидаза хрому) ковалентно зв'язується з антитілами. Це дозволяє швидко та точно виявляти збудників африканської чуми свиней, сказу, лейкозу та інших небезпечних хвороб.

4. Кормові добавки та дієтологія

Імобілізація дозволяє «захистити» ферменти, які додають у корми, від агресивного середовища шлунку.

- **Фітази та целюлази:** Імобілізовані у мікрокапсули ферменти активуються безпосередньо в кишечнику, допомагаючи тваринам краще засвоювати фосфор та рослинну клітковину. Це підвищує продуктивність тварин та зменшує витрати кормів.

5. Обробка продуктів тваринництва

У ветеринарно-санітарній експертизі іммобілізовані ферменти використовують для:

- Виявлення залишків антибіотиків у молоці та м'ясі.
- Очищення стічних вод тваринницьких ферм від органічних забруднень.

3.4. Значення ферментів для ветеринарії

Клінічна ензимологія – один із найважливіших розділів клінічної біохімії, який має свої завдання, специфічні методи дослідження та напрями, основними з яких є: вивчення ферментативних порушень у патогенезі різних захворювань (*ензимопатологія*); використання ферментів з діагностичною метою (*ензимодіагностика*); використання ферментів з лікувальною метою (*ензимотерапія*); використання ферментів у лабораторній практиці як високоспецифічних аналітичних реактивів.

Ензимопатологія – важлива галузь медичної ензимології, метою якої є дослідження активності ферментів за умов норми та патології, оскільки чисельні вади метаболізму є результатом дефекту того чи іншого фермента. У цьому контексті всі ферментопатії поділяють на первинні та вторинні. До першої групи належать спадкові захворювання обміну речовин, у патогенезі яких основну роль відіграє відсутність, нестача або аномальна структура

ферменту. Первинні або спадкові, ферментопатії виникають унаслідок змін у генетичному коді синтезу ферментів. Причинами ферментативних дефектів можуть бути: аномальна структура ДНК, порушення перенесення генетичного коду від ДНК до РНК, змінена структура РНК і порушення в передачі інформації від РНК до рибосом. Крім цього, причиною метаболічних розладів можуть бути генетично зумовлені порушення співвідношення природних активаторів та інгібіторів ферментів.

Механізм розвитку спадкових ферментопатій

У нормі метаболічний шлях можна представити як послідовність перетворень:

Субстрат А _ Продукт В _ Продукт С (за участю специфічних ферментів).

При спадковій дефіциті або повній відсутності певного ферменту виникає **метаболічний блок**, що призводить до наступних наслідків:

1. Нагромадження субстрату (Акумуляція). Оскільки фермент не працює, субстрат та його попередники не перетворюються далі й накопичуються в тканинах або біологічних рідинах.

- **Токсичний ефект:** Якщо ці речовини є токсичними (наприклад, фенілаланін при фенілкетонурії), вони пошкоджують клітини, особливо нервової системи.

2. Дефіцит кінцевого продукту. Організм перестає отримувати необхідну речовину, яка мала утворитися в результаті реакції. Це порушує фізіологічні функції, де цей продукт був задіяний.

3. Активація побічних шляхів обмін. Через неможливість прямого перетворення субстрат починає розщеплюватися альтернативними шляхами. Це часто призводить до утворення нетипових для організму продуктів, які посилюють інтоксикацію.

4. Вторинний метаболічний блок. Висока концентрація накопичених субстратів або їхніх побічних метаболітів може пригнічувати роботу **інших ферментів**, які самі по собі є генетично здоровими. Це створює ланцюгову реакцію порушень у суміжних обмінних процесах.

Так, при *галактоземії* (дефіцит галактозо-1-фосфатуридилтрансферази або галактокінази) відбувається накопичення в крові й тканинах галактозо-1-фосфату, вільної галактози та спирту дульциту – продукту відновлення галактози.

Високий їх вміст діє токсично, у молодняку після споживання молока спостерігають блювання та пронос, збільшується печінка, розвивається катаракта, затримується розумовий розвиток.

Відсутність у печінці фенілаланін-4-монооксигенази призводить до розвитку *фенілкетонурії*. Внаслідок блоку перетворення фенілаланіну на тирозин в організмі нагромаджується фенілаланін, фенілпіруват. Надлишок цих кислот порушує нормальний розвиток мозку молодняку та є причиною розумової відсталості, судом тощо.

Вторинні ферментопатії: Причини та механізми розвитку

На відміну від спадкових, **вторинні ферментопатії** розвиваються внаслідок зовнішнього впливу на здоровий організм, призводячи до дестабілізації ферментних систем.

1. Інфекційні та токсичні чинники. Ушкодження тканин вірусами, бактеріями, найпростішими або отрутами безпосередньо впливає на ферменти.

- **Механізм:** Екзо- та ендотоксини мікроорганізмів блокують біосинтез важливих білків-каталізаторів або пригнічують їхню активність.
- **Результат:** Важкі розлади обміну речовин, що формують клінічну картину конкретної інфекційної хвороби.

2. Ендокринні порушення. Оскільки гормони є головними регуляторами ферментативної активності, будь-який дисбаланс залоз внутрішньої секреції веде до ензимопатій.

- **Приклад (Цукровий діабет):** Дефіцит інсуліну створює подвійний негативний ефект:
 - **Пригнічуються** ферменти, відповідальні за окиснення (утилізацію) глюкози.
 - **Активуються** ферменти глікогенолізу (утворення цукру), ліполізу та розпаду білків.

3. Аліментарні чинники (Порушення живлення). Дефіцит поживних речовин у раціоні унеможливорює нормальну побудову ферментів.

- **Гіпо- та авітамінози:** Вітаміни часто є коферментами (активною частиною) ферментів.
- **Дефіцит нутрієнтів:** Нестача незамінних амінокислот, жирних кислот та мікроелементів зупиняє синтез ферментних систем.

Ензимодіагностика патологічних процесів

Ензимодіагностика: Ферменти як біомаркери хвороб

Ензимодіагностика базується на аналізі активності ферментів у біологічних рідинах. Це часто є більш чутливим методом, ніж загальні біохімічні тести, оскільки зміни активності ферментів часто передують появі клінічних симптомів.

1. Органоспецифічність та диференційна діагностика

Кожен орган має свій "набір" ферментів. Їх поява в крові свідчить про пошкодження конкретної тканини:

- **Печінка:** Для діагностики жовтяниць та гепатитів досліджують *фруктозомонофосфатальдолазу* та *сорбітолдегідрогеназу*. Перехід

хвороби у хронічну форму контролюють за допомогою АлАТ, АсАТ, аденозіндезамінази та 5-нуклеотидази.

- **Серце:** Для розрізнення інфаркту міокарда та стенокардії критично важливими є **креатинфосфокіназа (КФК), АсАТ та лактатдегідрогеназа (ЛДГ).**
- **Нирки:** Маркерами є сироваткова *гліцинамідинотрансфераза*, а також ферменти сечі (*лейцинамінонептидаза, β -глюкуронідаза*).

2. Моніторинг та прогноз

Ферменти дозволяють не лише поставити діагноз, а й стежити за лікуванням:

- **Випередження симптомів:** Рівень АлАТ зростає раніше, ніж підвищується білірубін або погіршується самопочуття.
- **Оцінка терапії:** Якщо після лікування активність ферментів не знижується, це свідчить про неефективність обраної тактики. Наприклад, амінотрансферази краще за білірубін показують швидкість відновлення печінки.

3. Значення ізоферментів

Дослідження ізоферментів (різних форм одного ферменту) дозволяє точно локалізувати осередок хвороби. При інфаркті міокарда в крові різко зростають специфічні ізоформи: **КФК-МВ, ЛДГ-1 та ЛДГ-2.**

Ензимодіагностика у ветеринарії

Оцінка стану внутрішніх органів тварин часто ускладнена неможливістю пацієнта поскаржитися на біль, тому аналіз ферментів є критично важливим.

- **Діагностика патологій печінки:** У великої рогатої худоби та коней при гепатозах і цирозах визначають активність **глутаматдегідрогенази (ГлДГ) та γ -глутамілтрансферази (γ -ГТ).** На відміну від людини, у жуйних тварин АлАТ менш активна в печінці, тому ГлДГ є надійнішим маркером пошкодження клітин.

- **Діагностика м'язових патологій:** Для виявлення міопатій, травм або серцевої недостатності у собак і коней використовують **Креатинкіназу (КК)**. Високі показники КК та АсАТ можуть свідчити про білом'язову хворобу у телят та ягнят (дефіцит селену та вітаміну Е).
- **Діагностика маститів:** Активність ферменту **N-ацетил-beta-D-глюкозамінідази (НАГ-аза)** у молоці корів зростає при запаленні молочної залози ще до появи видимих змін у молоці.

Ензимотерапія: Ферменти як ліки

Використання ферментів у медицині поділяється на замісну терапію та цілеспрямоване лікування патологічних процесів.

1. Замісна терапія

Застосовується при дефіциті власних ферментів організму.

- **Травлення:** Препарати *Панкреатин, Фестал, Мезим (Креон), Панзинорм*. Допомагають при хворобах ШКТ, переїданні протеїнами, малорухомому способі життя або порушенні жування.
- **Діагностика:** Використовуються для підготовки пацієнтів до УЗД чи рентгену черевної порожнини.

2. Хірургічне та протизапальне застосування

- **Протеази (Трипсин):** Зовнішньо очищують гнійні рани, а внутрішньом'язово — знімають запалення при гаймориті чи остеомиєліті.
- **ДНКаза:** У складі очних крапель руйнує ДНК вірусів, лікуючи вірусні кон'юнктивіти.

3. Специфічна терапія та реанімація

- **Тромболісис:** *Фібринолізин* розчиняє тромби в судинах.
- **Кровоспинні:** *Тромбін* використовують для зупинки кровотеч.
- **Детоксикація:** *Цитохром С* допомагає при отруєнні чадним газом, відновлюючи клітинне дихання.

- **Гіпотензивна дія:** *Калікреїни* знижують артеріальний тиск.

4. Онкологія

Аспарагіназа використовується для лікування деяких видів лейкозу. Пухлинні клітини часто не можуть самостійно синтезувати амінокислоту аспарагін. Фермент розщеплює наявний в організмі аспарагін, позбавляючи ракові клітини живлення, що призводить до їх загибелі.

Ензимотерапія у лікуванні тварин

Замісна терапія

У дрібних домашніх тварин (собаки, коти) часто діагностують **екзокринну недостатність підшлункової залози**.

- **Застосування:** Використовують ветеринарні препарати на основі панкреатину (наприклад, *Панкреалекс*). Це дозволяє тваринам засвоювати жири та білки, запобігаючи виснаженню.

Хірургія та гнійна патологія

Ветеринари часто стикаються з великими за площею інфікованими ранами, некрозами або ускладненими пологодами.

- **Протеолітичні ферменти:** Хімотрипсин та трипсин використовують для розрідження в'язкого секрету при ендометритах у корів та для лікування флегмон і абсцесів у коней.
- **Лізоцим:** Широко застосовується як природний антисептик для лікування слизових оболонок та очних хвороб у тварин.

Специфічне лікування (тромболізис)

У котів поширеною патологією є гіпертрофічна кардіоміопатія, що призводить до **артеріальної тромбоемболії**. Для розчинення тромбів у таких випадках екстрено застосовують стрептокіназу або тканинний активатор плазміногену.

Ферменти як кормові добавки

Це унікальна галузь ветеринарної дієтології, спрямована на підвищення засвоюваності кормів.

- **Фітази:** Додаються у раціон свиней та птиці. Тварини не мають власного ферменту для розщеплення фітинів рослин. Фітаза звільняє фосфор, що покращує ріст кісток та зменшує забруднення довкілля відходами.
- **Мультиензимні композиції (МЕК):** Містять амілази, протеази та целюлази. Вони компенсують нестачу власних ферментів у молодняка при ранньому відлученні від матері та переведенні на грубий рослинний корм.

Ветеринарна токсикологія та гігієна

Ферментативні методи використовують для швидкої ідентифікації отруєнь. Наприклад, при підозрі на отруєння тварини пестицидами (фосфорорганічними сполуками) визначають активність **холінестерази** в крові — її різке зниження підтверджує діагноз.

Ферменти як аналітичні реагенти

Ферменти, які застосовують для діагностики, отримують із різних джерел: рослин, тварин, мікроорганізмів (здебільшого бактерій). Їх широко використовують у клінічних лабораторіях як аналітичні реагенти для визначення кількості субстрату, ідентифікації медпрепаратів, визначення активності інших ферментів. Ці можливості пов'язані з каталітичними властивостями ферментів і високою специфічністю до субстратів каталізованих ними реакцій. Методи, що базуються на використанні ензимів, застосовують для визначення глюкози, сечовини, сечової кислоти, холестеролу тощо. Превагою цих методів є те, що відповідний субстрат для його визначення не потребує попереднього виділення та очищення і може бути ідентифікований у сироватці крові або іншій біологічній рідині.

4. Завдання 1. Визначення активності амілази (діастази) сечі за методом Вольгемута

Принцип методу: Визначення мінімальної кількості ферменту, здатної за 15 хвилин повністю розщепити 2 мг крохмалю. Цей обсяг приймається за одиницю амілазної активності.

Хід роботи :

- Підготовка розведень:** У 8 пробірок розливають по 1 мл 0,85% NaCl. Методом послідовного переносу (починаючи з 1 мл сечі в першій пробірці) готують ряд розведень, щоразу виливаючи 1 мл з останньої пробірки.
- Інкубація:** У кожен пробірку додають 2 мл 0,1% крохмалю. Суміш витримують у термостаті протягом 30 хвилин при 38 °С.
- Йодна проба:** Після охолодження додають по 2 краплі йодного реактиву.
- Облік результатів:** Для розрахунку обирають останню пробірку, де після додавання йоду розчин залишився жовтим (повний гідроліз).
- Розрахунок:** Виконується за формулою: $X = 1 * 2 * \text{розведення}$

де :

X – активність амілази слини в умовних одиницях (од).

1 – кількість сечі в мл; 2 – кількість 0,1% розчину крохмалю, в мл;

Показник	№ пробірки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Розведення сечі	2	4	8	16	32	64	12 8	25 6
1мл 0,85% розчину NaCl								
2 мл 0,1% розчину крохмалю								
Забарвлення йодної проби								

Результат:

Інтерпретація результатів та розрахунок

1. **Пошук критичної точки:** Необхідно знайти **останню** пробірку в ряду розведень, де розчин залишився жовтим. Це означає, що саме в цій пробірці мінімальна кількість сечі ще змогла розщепити доданий крохмаль.
2. **Формула:** Оскільки одиниця за Вольгемутом — це активність, що розщеплює 2 мг крохмалю за 30 хв при 38°C, розрахунок проводиться за формулою:

$$X = 2 * \text{Розведення}$$

*Наприклад: якщо жовтий колір зберігся у 4-й пробірці (розведення 16), то активність становить $2 * 16 = 32$ одиниці.*

Клініко-діагностичне значення визначення активності амілази (діастази) сечі за методом Вольгемута:

Нормальні значення активності амілази сечі (по Вольгемуту) знаходяться в межах 16–64 одиниць. При гострому панкреатиті активність амілази сечі і сироватки крові зростає в 10–30 разів. Визначення активності амілази сечі проводять з метою постановки діагнозу, а також коли хворого виписують з лікарні. Визначення активності амілази сечі проводять також після важко перенесеного паротиту для діагностики функціонального стану підшлункової залози, оскільки вірус, що викликає запалення привушних залоз може пошкодити і підшлункову залозу.

5. Визначення активності холінестерази в сироватці крові

Принцип методу: в основі методу лежить здатність ферменту холінестерази розщеплювати субстрат (ацетилхолін). Реакція відбувається за наступною схемою:

1. **Гідроліз:** Холінестераза розщеплює ацетилхолін на **холін** та **оцтову кислоту**.
2. **Зміна рН:** Утворення оцтової кислоти поступово закислює середовище, що призводить до зниження показника рН.
3. **Індикація:** Зміна кислотності фіксується за допомогою кольорового індикатора. Початкове **малинове забарвлення** (лужне середовище) поступово переходить у **жовте** (кисле середовище).
4. **Оцінка:** Швидкість або інтенсивність зміни кольору прямо пропорційна концентрації та активності ферменту в сироватці крові.

Хід роботи:

Перед роботою буферно-індикаторний і фізіологічний розчини витримують у термостаті при 37°C протягом 10 хвилин.

Паралельно готують дві проби згідно схеми:

Додати, мл	Досліджувана проба	Контрольна проба
Буферно-індикаторний розчин	2,5	-
Сироватка крові	0,5	0,05
Фізіологічний розчин	-	2,7
Ацетилхолін	0,1	-
Стоп-реагент	0,1	-

Суміш інкубують протягом 30 хвилин при температурі 37°C

Вимірюють оптичну щільність кожної проби відносно дистильованої води при 540 нм (зелений світлофільтр); кювети (10 мм).

Розрахунки проводять за формулою:

$$E = E_{xp} + E_{kp} - E_{dp},$$

де **Ехп**, **Екп** і **Едп** – поглинання холостої, контрольної і досліджуваної проби.

Значення **Ехп** видає старший лаборант, решту значень (**Екп**, **Едп**) студент визначає самостійно. Одержане значення **Е** використовують для пошуку по калібрувальному графіку активності холінестерази в сироватці крові.

Результат:

Клініко-діагностичне значення визначення холінестерази (**ХЕ**) в сироватці крові:

Нормальна активність холінестерази в сироватці крові знаходиться в діапазоні 45-95 мкмоль/сек•л.

Суттєве зниження активності **ХЕ** в сироватці крові спостерігається при захворюваннях печінки, гіпотиреозі, бронхіальній астмі, суглобовому ревматизмі, інфаркті міокарду, опіках, травматичному шоці, в післяопераційному стані. При важкій формі хвороби Боткіна активність **ХЕ** різко і стійко знижується впродовж всього жовтяничного періоду. При загостренні захворювання падіння активності **ХЕ** випереджає білірубіновий пік, граючи роль передвісника загострення. Динаміка зміни активності сироваткової **ХЕ** в процесі хвороби може мати прогностичне значення.

ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

1. Вкажіть одиницю активності ферменту, яка визначається кількістю ферменту, що перетворює 1 моль субстрату за 1 секунду в оптимальних умовах:

- A. Катал
- B. Стандартна міжнародна одиниця
- C. Умовна одиниця
- D. Число оборотів
- E. Молярна активність

2. Вкажіть метод досліджень, який використовується для виділення ферментативних систем окремих субклітинних фракцій з гомогенату тканини:

- A. Діаліз
- B. Ізоелектричне фокусування
- C. Диференційне центрифугування
- D. Якісний аналіз
- E. Рентгеноструктурний аналіз

3. Вкажіть фермент, активність якого слід визначати в сечі пацієнта при гострому панкреатиті:

- A. Амілаза
- B. Протеїназа
- C. Холінестераза
- D. Лейцинамінопептидаза
- E. Лужна фосфатаза

4. Для оцінки ступеню поразки паренхіми печінки у пацієнтів використовують тест визначення:

- A. Концентрації ізоформ ЛДГ₁ і ЛДГ₂ плазми крові
- B. Активності холінестерази плазми крові
- C. Активності амілази сечі
- D. Концентрації ізоформи ЛДГ₃ плазми крові

Е. Активності кислій фосфатази

5. Вкажіть клас ферменту, який каталізує тип хімічної реакції:



А. Ліази

В. Лігази

С. Оксидоредуктази

Д. Трансферази

Е. Гідролази

6. Вкажіть ізоформи лактат-дегідрогенази (ЛДГ), концентрація яких збільшується у плазмі крові пацієнтів з інфарктом міокарду:

А. ЛДГ₁ і ЛДГ₂

В. ЛДГ₃, ЛДГ₄

С. Тільки ЛДГ₃

Д. ЛДГ₄ і ЛДГ₅

Е. Тільки ЛДГ₅

7. Вкажіть фермент, активність якого визначають у плазмі крові пацієнтів з патологіями кісткової тканини:

А. Пепсин

В. Трипсин

С. Амілаза

Д. Кисла фосфатаза

Е. Лужна фосфатаза

8. Вкажіть фермент, активність якого стійко знижується при хворобі Боткіна:

А. Пепсин

В. Холінестераза

С. Амілаза

Д. Кисла фосфатаза

Е. Лужна фосфатаза

9. *Вкажіть фермент плазми крові, який використовують у терапевтичній практиці для зниження кров'яного тиску:*

- A. Ізоформа ЛДГ₁
- B. Трипсин
- C. Хімотрипсин
- D. Холінестераза
- E. Калікреїн

10. *Вкажіть патологію, при якій значення активності амілази сечі зростає в десять і більш разів:*

- A. Вірусний гепатит
- B. Гострий панкреатит
- C. Хронічний холецистит
- D. Інфаркт міокарду
- E. Цукровий діабет

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ ЗДОБУВАЧІВ

1. Доведіть білкову природу ферментів, дайте їм характеристику як каталізаторам.
2. Охарактеризуйте функціонально активні ділянки ферментів (активний та алостеричний центри).
3. Дайте визначення коферментам, вкажіть їх класифікацію, наведіть приклади.
4. Назвіть класи ферментів і притаманні їм типи реакцій.
5. Що таке ізоферменти, наведіть приклади.
6. Наведіть приклади застосування ферментів у ветеринарії.

РЕКОМЕНДОВАНА І ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Біологічна і біоорганічна хімія: у 2 книгах. Книга 2. Біологічна хімія. Ю. І. Губський, І. В. Ніженковська, М. М. Корда та ін.; за ред. Ю. І. Губського, І. В. Ніженковської. Київ: ВСВ «Медицина», 2021. 544 с.
2. Ветеринарна клінічна біохімія. В. І. Куртяк, В. Г. Стояновський, В. З. Комарницька та ін. Львів: ПП «Видавництво "БОНА"», 2019. 256 с.
3. Циганок Л.П., Бубель Т.О., Вишнікін А.Б., Вашкевич О.Ю. Аналітична хімія і хімічні методи аналізу: навчальний посібник; за редакцією проф. Л.П. Циганок. Дніпропетровськ. ДНУ імені О.Гончара 2014. 256 с.
4. Клінічна діагностика хвороб тварин. М. І. Цвіліховський, Л. П. Голоха, С. П. Береза та ін. Київ: «Аграрне освіта», 2016. 544 с.
5. Лабораторна діагностика у ветеринарній медицині: довідник за ред. В. В. Влізла. 3-тє вид. Львів: Афіша, 2015. 214 с.

Методичні рекомендації до лабораторних занять з дисципліни «Ветеринарна клінічна біохімія» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю Н 6 (211) «Ветеринарна медицина», галузі знань Н «Сільське, лісове, рибне господарство та ветеринарна медицина». Тема: «Ензимодіагностика». Змістовний модуль 2. / Тетяна ТОКАРЧУК, Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2026. 34 с. (1,54 ум.д.а.)