

Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины

Кафедра клинической диагностики

ФЕРМЕНТОДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Рекомендовано учебно-методическим объединением
по образованию в области сельского хозяйства в качестве
учебно-методического пособия для студентов учреждений
высшего образования, обучающихся по специальности
1-74 03 02 «Ветеринарная медицина»

Витебск
ВГАВМ
2020

УДК 619:616.3-07(07)

ББК 48.72

К56

Рекомендовано учебно-методическим объединением по образованию в области сельского хозяйства в качестве учебно-методического пособия для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина» (протокол № 79 от 30 сентября 2019 г.)

Авторы:

доктор ветеринарных наук, профессор *Ю. К. Ковалёнок*; кандидат ветеринарных наук, доцент *А. П. Демидович*; кандидат ветеринарных наук, доцент *А. М. Курилович*; кандидат ветеринарных наук *А. В. Напреенко*

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор УО «ГГАУ» *А. В. Глаз*; доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВО «СПбГАВМ» *Л. Ю. Карпенко*; кандидат ветеринарных наук, доцент *В. Н. Иванов*

Ферментодиагностика болезней животных : учеб. - метод. пособие
К56 для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина» / Ю. К. Ковалёнок и др. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 32 с.

Учебно-методическое пособие изложено в соответствии с учебной программой по клинической биохимии с эндокринологией и предназначено для помощи студентам и слушателям ФПК и ПК в подготовке к практическим и лабораторным занятиям, а также практической деятельности. В нем изложены основные сведения и базовые понятия о ферментах, методах их исследования и единицах измерения, распределении ферментов в органах и тканях животных; представлены механизмы гиперферментемий и диагностическое значение изменений активности отдельных ферментов.

УДК 619:616.3-07(07)

ББК 48.72

© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	Понятие о ферментах. Особенности строения.	4
2.	Распределение ферментов в органах и тканях	6
3.	Механизмы гиперферментемий	9
4.	Единицы измерения активности (количества) ферментов	10
5.	Методы определения активности (количества) ферментов	11
6.	Факторы, влияющие на каталитическую активность ферментов	13
7.	Диагностическое значение изменений активности ферментов:	19
	щелочная фосфатаза	20
	аминотрансферазы	21
	лактатдегидрогеназа	22
	сорбитолдегидрогеназа	22
	креатинкиназа	23
	γ -глутамилтранспептидаза	23
	альдолаза	24
	лейцинаминопептидаза	24
	холинэстераза	25
	α -амилаза	25
	липаза	26
	глутаматдегидрогеназа	26
	аргиназа	27
	Список сокращений	28
	Литература	29

1. ПОНЯТИЕ О ФЕРМЕНТАХ. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ

Ферменты, или **энзимы** – особый класс белков, являющихся биологическими катализаторами. Практически все метаболические реакции онтогенеза протекают в организме с участием белков-ферментов. Основная биологическая роль ферментов – ускорять¹ биохимические реакции. Ферментативная активность может регулироваться активаторами и ингибиторами. Вещество, на которое оказывает свое действие фермент, называют *субстратом*. Вещество, которое образуется в ходе химической реакции, называют *продуктом*.

Ферменты – это глобулярные белки, которые, исходя из особенностей строения, принято подразделять на простые (однокомпонентные) и сложные (двухкомпонентные).

Простой фермент состоит только из белковой части (аминокислот). У таких ферментов функцию взаимодействия с субстратом выполняет уникальное сочетание нескольких аминокислотных остатков, располагающихся в определенной части белковой молекулы. Чаще всего в состав такого центра у простого фермента входят остатки серина, цистеина, тирозина, гистидина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Это сочетание называется активным центром (АЦ) фермента. В АЦ выделяют два участка: участок связывания субстрата – *субстратный участок* (контактная площадка) и собственно *каталитический центр*². Субстратный центр образно называют «якорной площадкой», тут субстрат прикрепляется (как судно на якорь) к ферменту за счет различных взаимодействий между определенными боковыми радикалами аминокислотных остатков и соответствующими группами молекулы субстрата.

Аминокислотные остатки³, образующие АЦ простого фермента, расположены в различных точках единой полипептидной цепи. Поэтому каталитический центр возникает в тот момент, когда белковая молекула приобретает определенную структуру. Следовательно, изменение структуры фермента под влиянием тех или иных факторов⁴ может привести к деформации АЦ и изменению ферментативной активности.

Сложный фермент состоит из белковой и небелковой составляющей. Белковая часть называется *апоферментом (апоензиме)*, небелковая – *кофактором (соензиме)*. Кофактор в сложных ферментах выполняет функции каталитического центра. Апофермент и кофактор отдельно (!) друг от друга не обладают каталитической активностью.

Кофактор, прочно связанный с апоферментом, называется *простетической группой*. Кофактор, связанный с апоферментом нековалентными связями, легко отделяющимися при диализе, называется *коферментом*. Кофактором ча-

¹ В десятки, сотни, тысячи, а иногда и в миллионы (!) раз.

² Иногда в молекуле простого фермента каталитический и субстратный центры пространственно самостоятельны.

³ На область активного центра приходится всего лишь 25...100 часть (!) от объема фермента.

⁴ Ацидоз, алкалоз, отклонения от нормы осмотического и/или онкотического давления, токсемия, чужеродные или собственные (с измененной конформацией) белки, некоторые ветеринарные препараты.

ше всего являются вещества неорганической природы (ионы металлов Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} и др.), а значит в организм животного они должны поступать с кормом. Коферменты же – это вещества органической природы (витамины или вещества, построенные с участием витаминов B_1 , B_2 , B_5 , B_6 , B_{12} , H, Q и др.).

Помимо активного центра у ряда ферментов имеется *регуляторный* или *аллостерический* (от гр. *allos* – иной, чужой) центр, который в молекуле фермента, как правило, пространственно отделен от активного центра. Соответственно ферменты, имеющие аллостерический центр, называются *аллостерическими*. К этому центру присоединяются *эффекторы*, которые подразделяются на *активаторы* (*положительные*) и *ингибиторы* (*отрицательные*). Некоторые ферменты имеют несколько аллостерических центров, одни из которых специфичны к активаторам, другие – к ингибиторам. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и/или четвертичной структуры молекулы фермента, вызывая снижение или повышение ферментативной активности.

В настоящее время известно несколько тысяч ферментов в организме животных и человека. В этой связи существует несколько вариантов классификации энзимов:

1. Тривиальные названия ферментов (пепсин, трипсин, химотрипсин).
2. Название субстрата + суффикс –аза (липиды – липаза, сахароза – сахараза, мальтоза – мальтаза).
3. По типу катализируемой реакции (дегидрирование – дегидрогеназа, карбоксилирование – карбоксилаза).

Основой современной классификации ферментов, принятой Международным Советом Биохимиков (IUB), служит тип и механизм катализируемой реакции. Согласно данной классификации ферменты делят на шесть классов:

1. *Оксидоредуктазы* – катализируют окислительно-восстановительные реакции.
2. *Трансферазы* – катализируют реакции межмолекулярного переноса атомов, групп атомов, радикалов.
3. *Гидролазы* – катализируют расщепление внутримолекулярных связей органических молекул с участием воды.
4. *Изомеразы* – катализируют превращение органических соединений в их изомеры, т.е. реакции изомеризации. Этот класс сравнительно небольшой. В отличие от трансфераз, изомеразы катализируют перенос групп только внутри молекулы. Например, УДФ-глюкозо-эпимераза превращает галактозу в глюкозу.
5. *Лиазы (синтазы)* – катализируют разрыв связей C-O, C-C, C-N, а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов негидролитическим путем.
6. *Лигазы (синтетазы)* катализируют синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ.

Классы состоят из подклассов, подклассы – из подподклассов. Каждый фермент имеет специальный шифр, состоящий из 4 кодовых чисел, разделенных точками. Первая цифра характеризует класс реакции, вторая – подкласс,

третья – подподкласс, четвертая указывает порядковый номер фермента в его подподклассе. Например, фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ) имеет шифр 1.1.1.27, т.е. фермент относится к 1 классу (оксидоредуктазы), к 1-му подклассу (оксидоредуктазы, действующие на СН-ОН-редуктазы), к 1-му подподклассу (акцептором атомов водорода служит (никатинамидадениндинуклеотид) и занимает 27-ю позицию в перечне ферментов упомянутого класса.

Таким образом, зная шифр фермента, сравнительно легко ориентироваться в его типе и механизме катализируемой им реакции.

2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

В организме животных дифференциация органов и тканей в процессе роста и развития приводит к тому, что клетки специализируются в каком-то одном направлении, теряют универсальность и в них осуществляется синтез ограниченного числа ферментов, необходимых для осуществления той функции, для которой предназначен данный орган или ткань. Для понимания механизмов повышения активности тех или иных ферментов необходимо иметь представление о месте их синтеза и путях поступления в биологические жидкости.

Клеточные ферменты, в зависимости от их локализации в тканях, делят на две группы:

1. *Неспецифически локализованные ферменты (общие, универсальные)*, которые участвуют в жизнеобеспечении клетки и находятся практически во всех органах и тканях. К ним относятся ферменты синтеза белков, нуклеиновых кислот, клеточных структур и энергетического обмена.

При повреждении мембран клеток активность ферментов в крови повышается. Однако определение увеличения их активности в крови не позволяет установить место патологического процесса и поэтому их диагностическая значимость низкая.

2. *Органоспецифические (индикаторные) ферменты*, свойственные только определенному органу или ткани.

Ферменты этой группы представляют наибольший диагностический интерес, так как в клетках других органов и тканей их нет или находят следы их активности.

При повреждении органов и тканей ферменты этой группы высвобождаются в плазму крови, где их активность, соответственно, повышается, являясь своеобразным маркером локализации патологии. При остром процессе с гибелью большого числа клеток количественные изменения будут выражены более резко, чем при вяло текущем хроническом процессе.

Повышение в плазме активности какого-либо определенного фермента указывает на повреждение клеток той ткани, к которой этот фермент представлен в наибольшем количестве и сигнализирует о поражении конкретного органа.

Для более точного установления поврежденного органа или ткани необходимо определять не один индикаторный фермент, а несколько, например:

1. Сердечная мышца – ЛДГ-1, ЛДГ-2, КК-МВ, АСТ, АЛТ.
2. Скелетные мышцы – КК-ММ, ЛДГ-5, АСТ, АЛТ, альдолаза.
3. Костная ткань – ЩФ, альдолаза.
4. Мозговая ткань – КК-ВВ, ацетилхолинэстераза, АСТ.
5. Легочная ткань – ЛДГ-3.
6. Предстательная железа – КФ.
7. Печень – аргиназа, урокиназа, ОКТФ, СДГ, ГЛДГ, АДГ, АЛТ, АСТ, ЛДГ-4, ЛДГ-5.
8. Поджелудочная железа – альфа-амилаза, липаза.
9. Почки – глицин-амидиотрансфераза, ЩФ, ЛДГ-2, ЛАП, АСТ.

Большую диагностическую ценность имеет определение не только общей активности ферментов, но и их *изоферментов*⁵. На основании различных физических или химических свойств изоферментов определяют источник выхода фермента в кровь.

Например, фермент креатинкиназа (КК) имеет 3 изоформы: КК-МВ - характерен для сердечной мышцы и появляется в крови при инфаркте миокарда, КК-ММ - для поперечнополосатых мышц и обнаруживается при миозите, мышечной дистрофии, КК-ВВ - ткани мозга и появляется в крови при инсульте, травмах черепа. Фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ) имеет 5 изоформ. При этом ЛДГ-1 преобладает в сердце, почках и эритроцитах, ЛДГ-2 – в сердце, селезенке и лимфоузлах, ЛДГ-3 – в легких, ЛДГ-4 – в поджелудочной железе, плаценте, а ЛДГ-5 – в печени, скелетных мышцах.

Наблюдая повышенную, активность ЛДГ и зная ее изопротиль, мы можем установить поврежденный орган или ткань. Например, ЛДГ-1 значительно повышается в сыворотке крови при повреждении миокарда, гемолитической анемии, ЛДГ-2 и ЛДГ-3 – при остром лейкозе, ЛДГ-3, частично ЛДГ-4 и ЛДГ-5 – при болезнях легких, ЛДГ-5 - при вирусном гепатите, травме мышц.

Более глубокий уровень понимания процессов, происходящих в организме животных, дает определение *органеллоспецифических ферментов*. Внутри клеток ферменты распределены неравномерно. Одни из них находятся в коллоидно-растворенном состоянии в цитозоле, другие – в клеточных органеллах (структурированное состояние). Активность этих ферментов в плазме крови низкая или вообще отсутствует. Разным органеллам присущ специфический набор ферментов, который определяет их функции.

Определение активности органеллоспецифических ферментов позволяет судить о глубине поражения клетки (таблица 1).

Таблица 1 - Ферменты-маркеры внутриклеточных структур

Органелла	Маркер
Ядро	ДНК-полимераза
Митохондрия	Глутаматдегидрогеназа

⁵ *Изоферменты (изоэнзимы)* – это множественные формы одного и того же фермента, которые катализируют одну и ту же реакцию, но отличаются друг от друга по строению (т.е. первичной структуре) субъединиц и физико-химическим свойствам.

Рибосома	Высокое содержание РНК
Эндоплазматический ретикулум	Глюкозо-6-фосфатаза
Лизосома	Кислая фосфатаза Рибонуклеаза
Плазматическая мембрана	Na ⁺ -K ⁺ -АТФаза 5'-Нуклеотидаза Аденилатциклаза
Аппарат Гольджи	Галактозилтрансфераза
Пероксисома	Каталаза Уратоксидаза
Цитоскелет	Нет специфических ферментных маркеров
Цитозоль	Лактатдегидрогеназа Фосфофруктокиназа Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

Если повреждена только наружная клеточная мембрана, повышается активность в основном ферментов цитоплазмы, при более глубоких поражениях клетки и повреждении мембран клеточных органелл (митохондрий, лизосом, ядер и др.) в крови повышается активность соответствующих ферментов.

Индикаторные энзимы, в зависимости от путей поступления в биологические жидкости, в свою очередь, подразделяются на секреторные и экскреторные.

Секреторные (плазмспецифические) ферменты синтезируются, как правило, в печени, затем поступают в кровь, где выполняют специфические функции. Их активность в сыворотке крови выше, чем в клетках или тканях. Типичными представителями данной группы являются псевдохолинэстераза, белковые факторы систем свертывания крови, фибринолиза и кининогенеза, ренин.

В клинической практике они представляют интерес, когда их активность в плазме крови становится ниже нормы за счет нарушения функции печени или накопления ингибиторов.

Экскреторные ферменты синтезируются в железах желудочно-кишечного тракта (слюнные железы, поджелудочная железа, печень) и выделяются в просвет кишечника, где обеспечивают процесс пищеварения. В норме их активность в сыворотке крови низкая и постоянная.

При воспалении, когда нарушается их экскреция, активность этих ферментов в сыворотке крови значительно увеличивается.

Например:

1. Слюнные железы – амилаза слюны.
2. Поджелудочная железа – амилаза, липаза, трипсин.
3. Желчевыводящие пути – ЩФ, ГГТ, ЛАП, глюкуронидаза, 5-нуклеотидаза.

3. МЕХАНИЗМЫ ГИПЕРФЕРМЕНТЕМИЙ

Увеличение активности ферментов в биологических жидкостях называется **гиперферментемией**.

Возрастание ферментативной активности сыворотки крови при многих патологических процессах и болезнях может быть результатом выхода в кровяное русло ферментов вследствие: **а)** ускорения процессов их синтеза (например, щелочная фосфатаза при рахите, гепатите); **б)** некроза клеток (например, креатинкиназа, АСТ при инфаркте миокарда); **в)** понижения выведения (например, щелочная фосфатаза при закупорке желчных путей); **г)** повышения проницаемости клеточных мембран (например, АСТ и АЛТ при вирусном гепатите). Данные изменения могут происходить на фоне продолжающегося биосинтеза ферментов поврежденными клетками. Повышение активности некоторых энзимов в биологических жидкостях также может быть опосредовано расстройствами механизмов внутриклеточной регуляции обмена веществ. Удаление ферментов из крови осуществляет система макрофагов многих органов.

Повышение уровня внутриклеточных ферментов в плазме крови прямо зависит от времени действия этиологического фактора, степени повреждения биологических мембран клеток и субклеточных структур, содержания ферментов в клетках, а также от прочности связи ферментов с биологическими мембранами, массы органов и т.д. Важно также иметь представление об особенностях распределения ферментов в органах и тканях, а также их внутриклеточной локализации (см. раздел 2).

Особое значение при интерпретации полученных результатов исследований имеет знание периода полужизни (полураспада) в плазме крови каждого из диагностических ферментов, что делает важным выбор точного времени для ферментного анализа крови (таблица 2).

Выше отмечено, что в кровь ферменты поступают из клеток посредством различных механизмов, а уровень активности зависит многих условий.

Характер повреждения клеток оказывает значительное влияние на скорость выхода ферментов в биологические жидкости. При воспалительных процессах, сопровождающихся увеличением проницаемости мембран, высвобождаются ферменты цитоплазмы и не выходят в кровь митохондриальные энзимы.

Таблица 2 – Периоды «полужизни» некоторых ферментов в крови

Название фермента	Период «полужизни»
Аспаратаминотрансфераза	17±5 часов
Аланинаминотрансфераза	47±10 часов
Креатинкиназа	15 часов
Щелочная фосфатаза	3-7 дней
Амилаза	10 дней
ЛДГ-1	113 часов

При некротических состояниях разрушение клетки приводит к появлению в сыворотке крови ферментов митохондрий и других органелл (глутаматдегидрогеназы, АСТ и др.).

Скорость выхода различных ферментов из поврежденных тканей неодинакова. На этот процесс воздействует концентрационный градиент, он неодинаков для различных типов клеток. Так, в клетках печени содержание ЛДГ выше в 3 тысячи раз, чем вне клеток: 3000:1, а в эритроцитах этот перепад только – в 200 раз. Ферменты с высоким концентрационным градиентом быстрее выходят за пределы клетки, чем ферменты с меньшим градиентом.

На скорость выхода ферментов из клетки оказывает влияние размер молекул. Более мелкие высвобождаются на ранней стадии повреждения и диффундируют с большей скоростью, чем крупные.

Масса органа может определять количество выходящих из него при патологии ферментов.

Особый интерес для энзимодиагностики болезней представляет исследование активности индикаторных ферментов в сыворотке крови. Так, по появлению в плазме или сыворотке крови ряда тканевых ферментов в больших количествах можно судить о функциональном состоянии и поражении различных органов (например, печени, сердечной и скелетной мускулатуры).

Например, при остром инфаркте миокарда особенно важно исследовать активность креатинкиназы, АСТ, ЛДГ и оксibuтиратдегидрогеназы. При заболеваниях печени, в частности при вирусном гепатите, в сыворотке крови значительно увеличивается активность АЛТ и АСТ, глутаматдегидрогеназы и некоторых других ферментов. Однако большинство ферментов, вырабатываемых в гепатоцитах, синтезируются и клетками других органов. Поэтому наибольшее диагностическое значение имеет определение активности органоспецифических для печени ферментов: глyтидазы, сорбитолдегидрогеназы, аргиназы и орнитинкарбамоилтрансферазы. Изменение активности этих ферментов в сыворотке крови свидетельствует о поражении именно печеночной ткани. Уровень липазы, амилазы, трипсина и химотрипсина в крови резко увеличен при сахарном диабете, злокачественных поражениях поджелудочной железы, болезнях печени и др.

4. ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ (КОЛИЧЕСТВА) ФЕРМЕНТОВ

В отличие от большинства других биохимических компонентов биологических жидкостей количество ферментов не может быть измерено в молях или мг, за небольшим исключением. Объясняется это тем, что количество молекул фермента в исследуемом материале крайне мало и существующими биохимическими методами такие количества не удастся измерить. **О количестве фермента косвенно судят по его активности, то есть по производимому ферментом действию.** Другими словами, присутствие и количество ферментов в исследуемом материале распознается по скорости катализируемой ими реакции в определенных условиях измерения. В большинстве случаев скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна концентрации фермента, т.е.

определив по скорости реакции активность фермента, можно оценить концентрацию фермента в биологической жидкости.

Под активностью фермента понимают то количество субстрата, которое перерабатывает фермент за единицу времени. В норме активность ферментов в сыворотке (плазме) крови – результат сбалансированности скорости синтеза фермента в клетках и выхода из них со скоростью удаления их из внеклеточной жидкости путем инактивации и экскреции.

Для выражения концентрации фермента и количественной оценки его активности в условных единицах Комиссией по ферментам Международного биохимического союза была рекомендована стандартная международная единица (Е или U). **1 Е (U)** – это количество фермента, которое в оптимальных условиях катализирует превращение **1 микромоля** субстрата (или образование 1 микромоля продукта) **в минуту** (мкмоль/мин).

В связи с введением Международной системы единиц (СИ) предложено новое выражение активности фермента в каталах (кат, kat). **1 кат** соответствует количеству фермента, которое катализирует превращение **1 моля** субстрата (или образование 1 моля продукта) **в секунду** (моль/сек).

Отношение международной единицы (U) к каталу можно выразить следующим образом: 1 U фермента соответствует 16,67 нкат.

В медицине концентрацию ферментов в биологических жидкостях принято выражать в единицах активности на литр (МЕ/л, кат/л).

5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ (КОЛИЧЕСТВА) ФЕРМЕНТОВ

Ферменты, в отличие от органических или неорганических веществ, присутствуют в клетках в чрезвычайно малых количествах, и определение их содержания в тканевых экстрактах или жидкостях представляет особую проблему. В этой связи, для оценки количества фермента в биосубстрате, измеряют *скорость* реакции, катализируемой содержащимся в этой пробе ферментом. При определенных условиях измеряемая скорость пропорциональна количеству присутствующего фермента. Поскольку при этом трудно определить число молекул фермента в пробе или их общую массу, результаты выражают в условных единицах активности фермента (см. раздел № 4).

При этом все методы, используемые для определения активности ферментов, подразделяют на следующие группы:

1. Колориметрические методы. В основе этих методов лежит измерение при помощи колориметров интенсивности окраски веществ, образующихся при взаимодействии субстрата или продукта реакции со специфическими реагентами, добавленными в пробу, как правило, после остановки ферментативной реакции. Интенсивность окраски полученного раствора прямо пропорциональна активности присутствующего фермента.

Методы этой группы используют для определения активности ЩФ, КФ, амилазы, липазы, ХЭ, ЛАП, ГГТ.

2. Спектрофотометрические методы. Эти методы основаны на поглощении света в определенных участках спектра многими соединениями, являющимися кофакторами, субстратами или продуктами реакции. Для измерения спектров поглощения этих соединений используют специальные приборы – спектрофотометры, которые позволяют регистрировать световые потоки в широком интервале длин волн (от 185 до 1100 нм) и обеспечивают высокую степень монохроматичности света, проходящего через анализируемую среду. Этот метод отличается высокой чувствительностью, быстротой определения, малым расходом фермента и реактивов и позволяет следить за течением реакции во времени.

3. Флюориметрические методы. Определение активности ферментов может быть основано не только на измерении поглощения света, но и на измерении его излучения – флюоресценции. Некоторые коферменты и субстраты обладают флюоресценцией. Так, восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид или его фосфат (NADH или NADPH) обладают сильной флюоресценцией, а их окисленные формы (NAD⁺ и NADP⁺) не флюоресцируют. При этом интенсивность свечения пропорциональна содержанию исследуемого вещества.

Такое определение активности ферментов в ряде случаев по чувствительности превосходит спектрофотометрические методы на целый порядок величины (100...1000 раз). Поэтому флюориметрию используют для изучения кинетики и механизма действия никотинамидных и флавиновых ферментов (КФ, ЩФ, ЛАП) в биоптатах ткани.

При проведении фотометрических исследований оценку результатов чаще всего проводят двумя способами:

1. Измерение по конечной точке (одноточечная кинетика).

В основе данного способа лежит инкубация сыворотки с субстратом в соответствующем буфере в течение заданного времени. В ходе реакции происходит образование окрашенных продуктов. Для регистрации результатов необходимо прерывание реакции через фиксированный промежуток времени. Для этого чаще всего используются агрессивные реагенты, такие как кислоты, спирты, щелочи и т.д., останавливающие ферментативную реакцию. Отсюда и название метода – «по конечной точке», т.е. с остановкой реакции.

2. Измерение многоточечное (кинетическое).

Способ основан на непрерывном или периодическом определении оптической плотности реакционной смеси через равные промежутки времени в ходе ферментативной реакции. Скорость изменения оптической плотности прямо пропорциональна активности фермента.

Кинетическое исследование является более точным, поскольку определяют не конечный продукт ферментативной реакции, а кинетику самой реакции. Многоточечная кинетика используется только для биохимических анализаторов, например, для определения активности ферментов АЛТ, АСТ, ЛДГ, КК и др.

4. Манометрические методы. Эти методы используются при определении активности ферментов в тех случаях, когда в исследуемых реакциях проис-

ходит выделение или поглощение газов. К таким реакциям относятся главным образом те, которые связаны с процессами окисления и декарбоксилирования, сопровождающимися поглощением или выделением кислорода и углекислоты, а также реакции, в которых выделение или связывание газа происходит в результате взаимодействия продуктов ферментативного превращения с добавленным в систему реактивом (оксидазы – по поглощению O_2 , холинэстеразы, декарбоксилазы – по выделению CO_2 , каталаза - по выделению O_2). Наблюдение за ходом реакции проводится в специальных приборах - манометрических аппаратах Варбурга.

Преимуществом этого метода является высокая чувствительность, незначительный расход материала, возможность изучать динамику процесса.

5. Поляриметрические методы. В основе этих методов лежит измерение угла вращения плоскости поляризации линейно поляризованного света оптически активными веществами.

Многие ферменты действуют только на один из оптических изомеров своих субстратов. Если продукт реакции оптически неактивен, то за ходом реакции следят по изменению оптического вращения. Аналогичная ситуация возникает и в том случае, когда субстрат оптически неактивен, но в ходе реакции образуется оптически активный продукт или когда и субстрат, и продукт оптически активны, но значительно различаются по величине удельного вращения.

Этот метод может быть использован при изучении ферментов, по отношению к которым другие методы неприменимы, особенно при изучении ферментов, действующих на углеводы. Классическим примером может служить β -фруктофуранозидаза (сахараза).

6. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

На результат определения активности ферментов оказывает влияние большое число факторов, которые подразделяют на пре- и собственно аналитические.

I. Преаналитические (время взятия крови, физическая нагрузка, методика взятия крови, транспортировка проб в лабораторию и хранение до анализа, влияние лекарственных средств и лечебных процедур).

Ошибки, возникающие на внелабораторном этапе анализа, составляют до 70% от общего их числа. Именно они могут оказаться непоправимыми и полностью обесценить весь ход проводимых исследований.

II. Аналитические (концентрация фермента и субстрата, температура, pH среды, присутствие ингибиторов и активаторов, давление, свет и др.).

ВЛИЯНИЕ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

1. Время. Для ограничения влияния суточных вариаций состава крови на результаты анализа необходимо всегда брать пробы в одно и то же время.

Кровь принято отбирать утром, до кормления, у жвачных – до или через 4 часа после кормления. При повторном исследовании отбирать материал необходимо также в это время дня.

После приема корма определение активности ферментов (липаза, амилаза, АСТ, АЛТ, ХЭ, КК, КФ, ЩФ, ЛДГ) может затрудняться вследствие мутности сыворотки крови, вызванной хиломикронемией.

2. Физическая нагрузка. Значительные сдвиги активности ферментов связаны с физической нагрузкой. Так, активность ферментов КК, АСТ, АЛТ, ЛДГ, альдолаза может оставаться повышенной в течение 24 ч после 1 однократной интенсивной физической нагрузки. И, наоборот, при их отсутствии повышается активность ЩФ, ГГТП в сыворотке крови. Поэтому не следует давать высокую двигательную нагрузку на животное за сутки до предполагаемого взятия крови.

Кроме того, в зависимости от положения тела в пространстве, изменяются (как правило повышаются) показатели активности ферментов в крови (АСТ, КФ и ЩФ), что связано с движением воды, и фильтрующихся веществ из внутрисосудистого в интерстициальное пространство.

3. Методика взятия крови. Процесс отбора биологического материала должен быть максимально безболезненным и быстрым. Беспокойство, болевая реакция, длительный венозный застой в месте введения иглы или ланцета значительно изменяют состав крови и активность ферментов (таблица 3).

Таблица 3 - Влияние процедуры взятия крови на результаты определения активности ферментов

Показатель	Влияние
Продолжительный венозостаз	Гипоксия и увеличенная проницаемость мембран клеток крови
Механические повреждения	Выпускание крови из шприца в пробирку с силой и интенсивное встряхивание при перемешивании
Гемолиз	При длительном стоянии крови появляющиеся радикалы кислорода (O_2^{\cdot}) и дефицит субстратов приводят к порозности мембран эритроцитов
Свертывание	Появляются в сыворотке ферменты из тромбоцитов, в частности, кислая фосфатаза

Взятие материала всегда проводят до лечебных процедур, особенно внутривенных инъекций электролитов, раствора глюкозы. Также необходимо учитывать лекарственные и биологические препараты, которые вводились животному, например, вакцины, сыворотки, иммуноглобулины и пр.

Проведение аутогемотерапии, новокаиновых блокад, введение масляных растворов могут сопровождаться существенными повышениями активности ферментов, вследствие их высвобождения из поврежденных в процессе инъекции тканей.

Влияние лекарственных средств на результаты лабораторных исследований может быть двух типов:

1. Физиологическое влияние *in vivo* (в организме пациента) лекарственных средств и их метаболитов.

2. Влияние *in vitro* (на химическую реакцию, используемую для определения показателя) благодаря химическим и физическим свойствам лекарственных средств (интерференция).

Интерференция может быть вызвана следующими факторами:

- Гемолиз, т.е. разрушение эритроцитов с выходом в жидкую часть крови ряда внутриклеточных компонентов, что изменяет истинные результаты определения активности ферментов (ЛДГ, АЛТ, АСТ, КК, КФ, аргиназа). Гемолизированную сыворотку и плазму не рекомендуется использовать для исследований, за исключением редких случаев (н-р, фруктозомонофосфатальдолаза).

- Липемия (хилез), т.е. повышенное содержание в крови, взятой натощак, нейтральных жиров, которая вызывает ложные результаты ряда колориметрических и нефелометрических методов исследования (особенно при исследовании фосфора, общего билирубина, общего белка, электролитов) и активности ферментов (липаза, амилаза, ЩФ, ХЭ).

- Парапротеинемия, т.е. наличие в крови аномальных белков, вызывает изменения результатов определения некоторыми методами таких ферментов, как КК, ЛДГ, амилаза.

- Антикоагулянты. Следует учитывать, что многие антикоагулянты (таблица 4) способны ингибировать (иногда, напротив, усиливать) активность ферментов.

Таблица 4 – Влияние антикоагулянтов на активность ферментов (по В.С. Камышникову, 2002)

Антикоагулянт	Ферменты, определению которых мешает применяемый антикоагулянт
Натрия оксАЛТ	ЩФ, альфа-амилаза
Аммония оксАЛТ	ЩФ, альфа-амилаза
Тринатрий цитрат	Альфа-амилаза
Гепарин	-
Лития гепаринат	ЩФ
ЭДТА (Трилон Б)	КФ, ЩФ

Известно, что оксАЛТы снижают активность ЛДГ, ЭДТА (Трилон Б) - ингибирует активность КФ и ЩФ, в то время как салицилаты повышают активность аминотрансфераз (АСТ, АЛТ).

- Мутность сыворотки может быть обусловлена ростом бактерий, попавших в пробу, особенно при длительной транспортировке и неправильном хранении. В этих случаях материал не пригоден для анализа. Поэтому полученный материал сразу же помещается в чистую и закрытую посуду. Контакт с внешней средой не допускается.

4. Транспортировка проб в лабораторию и хранение до анализа

Для получения достоверных результатов исследований необходимо отправлять в лабораторию свежие пробы крови (в течение 1...2 ч). При транспор-

тировке проб крови необходимо избегать их встряхивания, вспенивания или замерзания (в холодное время года), чтобы не вызвать гемолиз эритроцитов.

При невозможности транспортировки проб в лабораторию необходимо отделить плазму от форменных элементов, для предотвращения попадания ферментов из эритроцитов и тромбоцитов в плазму крови.

Для непродолжительного хранения пробы помещают в холодильник при температуре 4⁰ С. Для большинства ферментов (таблица 5) активность не изменяется при комнатной температуре в течение 6...8 ч, при 4⁰ С – около недели и на протяжении одного месяца – в замороженном состоянии. Считается, что при температуре -25⁰ С активность ферментов минимальная.

Более длительное хранение проб, как правило, сопровождается снижением активности ферментов, за счет активации процессов протеолиза, потери ферментами четвертичной структуры и блокады SH-групп.

Известно, что активность креатинкиназы (КК) и кислой фосфатазы (КФ) даже при температуре 4⁰ С относительно быстро уменьшается, тогда как АЛТ, АСТ и, особенно, ГГТП, амилаза и липаза более стабильны при хранении в холоде. ЛДГ, напротив, теряет активность при низкой температуре быстрее, чем при комнатной температуре. Подвергать сыворотку заморозке необходимо только при длительном сроке хранения (более 4 дней). Не допускается многократное размораживание и замораживание проб.

Таблица 5 – Уменьшение активности ферментов в сыворотке при хранении (согласно О.А. Тимин [и др.], 2002)

Ферменты	Температура хранения	
	20...25°С	2...8°С
Аланинаминотрансфераза	3 дня – 17%	3 дня – 10%
Аспаратаминотрансфераза	3 дня – 10%	3 дня – 8%
Альдолаза	5 дней – 15%	5 дней – 8%
α-Амилаза	5 дней – без снижения	5 дней – без снижения
Холинэстераза	7 дней – без снижения	7 дней – без снижения
Креатинкиназа	24 часа – 2%	7 дней – 2%
Креатинкиназа (МВ)	1 час < 10%	24 часа < 10%
Глутаматдегидрогеназа	3 дня – 15%	3 дня – 5 %
γ-Глутамилтранспептидаза	до 7 дней	7 дней – без снижения
Лактатдегидрогеназа	7 дней – 5%	3 дня – 8%
Лактатдегидрогеназа - 1	7 дней – 5%	7 дней – 5%
Кислая фосфатаза	7 дней без снижения	7 дней без снижения (стабилизация 0,5% NaHSO ₄)
Щелочная фосфатаза	7 дней – 10%	7 дней – без снижения
Лейцинаминопептидаза	до 7 дней	7 дней – без снижения
Липаза	24 часа	5 дней – без снижения

5. Другие факторы. Среди других биологических факторов, оказывающих существенное влияние на результаты лабораторных исследований, следует отметить постоянно действующие факторы: вид и порода животного, пол, возраст, тип конституции, направление продуктивности, характер и режим кормления. Большое влияние оказывают и факторы внешней среды - географические, климатические, сезонные, особенности химического состава корма и воды, обусловленные параметрами биогеопроекции, а также размер стада, иерархические взаимоотношения в популяции или с соседями по месту обитания.

ВЛИЯНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

В лабораторных условиях на скорость ферментативных реакций влияют следующие факторы:

1. Концентрация фермента.

Для большинства ферментов скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации фермента в реакционной смеси, при условии, если содержание субстрата в пределах оптимума или немного выше. Это справедливо, например, для реакций, катализируемых ЩФ. Некоторые ферменты (например, АСТ и АЛТ) не подчиняются этой закономерности. При уменьшении их концентрации в реакционной смеси скорость реакции не снижается пропорционально. Это связано со сложными структурными перестройками в молекулах ферментов при разбавлении.

2. Концентрация субстрата.

Концентрация субстрата - один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции. Концентрация субстрата, при которой достигается максимальная скорость реакции, называется насыщающей концентрацией. При снижении концентрации субстрата в реакционной смеси скорость реакции также снижается. Концентрации субстрата выше насыщающей могут привести к ингибированию фермента и снижению скорости ферментативной реакции.

Таким образом, в определенных пределах скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата, а начиная с определенной (насыщающей) его концентрации скорость реакции не меняется с возрастанием концентрации субстрата.

3. Температура.

Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом.

Для большинства ферментов животного происхождения он равен 40–50⁰ С, для растительного происхождения он равен 50 – 60⁰ С. Исключением являются папаин, наибольшая активность которого проявляется при 80⁰ С, и каталаза, температурный оптимум которой лежит между 0 и 10⁰ С.

Ускорение реакций под воздействием повышенной температуры обусловлено тем, что снижается энергия активации как субстрата, так и фермента.

В интервале температур 0...40⁰ С повышение температуры на 10⁰ С увеличивает скорость ферментативных реакций в 1,5–2 раза (правило Ле Шателье). При температурах свыше 50⁰ С активность ферментов понижается, так как начинается процесс тепловой денатурации ферментных белков, вызывающий необратимое разрушение структур белковых молекул. Почти все ферменты разрушаются при температуре 80...100⁰ С⁶.

Понижение температуры снижает скорость ферментативных реакций. Большинство ферментов при 0⁰ С еще не утрачивают своих каталитических свойств, но при замораживании химические реакции прекращаются. При последующем оттаивании ферментативная активность клеток может быть восстановлена.

4. Реакция среды (рН).

Для большинства известных в настоящее время ферментов известна область значений рН (оптимум рН), при которых они проявляют максимальную активность (таблица 6).

Таблица 6 - Оптимальные значения рН для некоторых ферментов

Фермент	рН	Фермент	рН
Пепсин	1,5...2,5	Каталаза	6,8...7,0
Катепсин В	4,5...5,0	Уреаза	7,0...7,2
Амилаза из солода	4,9...5,2	Липаза панкреатическая	7,0...8,5
Сахараза кишечная	5,8...6,2	Трипсин	7,5...8,5
Амилаза слюны	6,8...7,0	Аргиназа	9,5...10,0
ЩФ	9,9...10,3	АСТ и АЛТ	7,2...7,4

Большинство ферментов организма животного проявляет максимальную каталитическую активность при рН = 7. Изменения рН замедляют или прекращают действие ферментов.

Наличие оптимума рН можно объяснить тем, что ферменты представляют собой полиэлектролиты и их заряд зависит от значения рН.

Согласно современным представлениям, влияние рН на активность ферментов объясняется структурой их молекул. Молекула фермента имеет один или несколько активных центров, в которых сконцентрированы функциональные группы белков. Степень их ионизации зависит от рН среды. Более того, рН среды оказывает влияние на степень ионизации субстратов, фермент-субстратного комплекса и продуктов реакции, структуру молекулы фермента. Все это вместе и определяет каталитическую способность фермента в той или иной реакции.

5. Присутствие ингибиторов и активаторов.

Существенное влияние на активность ферментов оказывает наличие в среде определенных химических веществ: активаторов, повышающих активность ферментов, и ингибиторов, подавляющих ее.

⁶ Известен фермент – миокиназа, который может переносить температуру +100⁰ С.

Активаторами ферментов являются ионы металлов: Na^+ , K^+ , Rb^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} и соединения, содержащие сульфгидрильные группы: SH , HCN , H_2S .

Часто одно и то же вещество служит активатором одних ферментов и ингибитором других. Ингибирование ферментов может быть обратимым и необратимым.

При обратимом ингибировании не происходит безвозвратной потери каталитической активности фермента, так как ингибитор не разрушает пространственной структуры ферментного белка и после отделения ингибитора от фермента активность последнего восстанавливается.

Различают ингибиторы общего и специфического характера. К общим ингибиторам, которые подавляют действие всех ферментов, относят соли тяжелых металлов (свинца, серебра, ртути), трихлоруксусную кислоту и танин.

Специфические ингибиторы действуют только на определенные ферменты. Так, синильная кислота действует только на окислительные ферменты, содержащие в активном центре железо или медь. Она вступает в соединение с металлами, и фермент теряет активность.

7. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Нормативные значения активности ферментов в крови здоровых животных, как указывалось ранее (разделы 2 и 3), зависят от многих обстоятельств и балансируют в сравнительно широком диапазоне (таблица 7).

Изменение активности ферментов в крови часто носит достаточно высокую диагностическую значимость. Клиническая интерпретация наиболее производственно значимых ферментов представлена ниже.

Таблица 7 – Нормативные интервалы активности (ЕД/л) некоторых ферментов сыворотки крови взрослых животных (по Д.Мейер, Д. Харви, 2007)

Показатель	Лошадь	Корова	Свинья	Овца	Собака	Кошка
ЩФ	102...257	29...99	26...362	68...387	10...73	15...92
АЛТ	4...12	17...37	32...84	60...84	15...58	30...100
АСТ	152...294	48...100	9...113	8...278	16...43	12...56
ХЭ	2597...8716				1347...2269	1000...2000
КК (КФК)	113...333	44...228	221...1746	37...98	40...254	59...527
ГГТ	9...25	20...48	19...37	46...62	1...5	0...2
СДГ	1,9...5,8	4,3...15,3	1...6	6...28	2,9...8,2	3,9...7,7
ЛДГ	426...718	812...1224	255...492	187...384	23...220	35...220
Альдолаза	3,6...16,9	16,8...46,7				
ЛАП	1...5	13,6...21,2				
α -амилаза	9...34	12...107			510...1864	365...948
Липаза					13...200	0...83
ГлДГ	0...35,6	0...5,8	0...3	0...4,6		

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА (КФ 3.1.3.1)

Сокращенное обозначение: **ЩФ** (рус.), **AP** (англ.), **SAP** (англ.).

ЩФ катализирует гидролиз органических эфиров фосфорной кислоты. Объединяет ряд ферментов, оптимум pH которых для определения активности составляет *in vitro* 9...10.

ЩФ широко распространена в организме и находится в высокой концентрации в костях (в остеобластах), слизистой оболочке кишок, клетках канальцевого эпителия почек, печени, плаценте. Каждая из этих тканей имеет свой отдельный изофермент. В печени ЩФ содержится в эндотелии синусоидов и в гепатоцитах, примыкающих к желчным канальцам.

У собак обнаружен отдельный изоэнзим, синтез которого индуцируется кортикостероидами.

Для определения отдельных изоферментов используют электрофорез, тепловую инактивацию, подавление активности L-фенилаланином и мочевиной.

Материалом для исследования является сыворотка или плазма крови без следов гемолиза. Нужно иметь в виду, что при исследовании плазмы в качестве стабилизатора не рекомендуется использовать оксАЛТы, трилон-Б и гепарин, так как они оказывают ингибирующее действие на фермент.

Образцы для исследования рекомендуется хранить в холодильнике при 4°C не более 48 часов. При комнатной температуре ЩФ более стабильна и ее активность существенно не меняется в течение нескольких дней. В размороженных образцах активность ЩФ быстро падает.

Чаще к определению ЩФ прибегают при оценке состояния печени. Особенно сильно увеличивается ее активность в крови при холестазах. Например, у собак при холестазах она может увеличиваться до 70 раз, а при остром гепатите – лишь в 2...3 раза. У кошек при обструкции желчных путей ЩФ обычно повышается в 4...9 раз.

Данный фермент также может служить биохимическим маркером кальций-фосфорного обмена в костной ткани, т.е. является скрининговым тестом остеодистрофии. При поражении костной ткани (рахит, остеопороз, остеомалация, переломы) активность ЩФ в крови увеличивается примерно в 2...3 раза.

Ветеринарному специалисту важно знать, что у молодняка животных в связи с интенсивным остеогенезом очень высок уровень костного изофермента. Из-за этого общая активность ЩФ у них примерно в 1,5...2 раза выше, чем у взрослых животных.

У собак есть особый изофермент, выработка которого индуцируется кортикостероидами. Поэтому из анамнеза важно выяснять, не проводилось ли лечение животного при помощи таких препаратов. Например, 17-дневный курс применения кортикостероидов может вызвать 40-кратное увеличение активности ЩФ, которое может сохраняться в течение нескольких месяцев после прекращения лечения.

К значительной гиперферментемии могут приводить опухоли коры надпочечников и гипофиза.

Повышение активности также наблюдают при раковых опухолях, болезнях мышц, гиперпаратиреозе, назначении сульфаниламидов, эритромицина, тетрациклина, линкомицина.

Понижение активности ЩФ в крови возможно при гипотиреозе, анемии, гипервитаминозе Д.

АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

Аминотрансферазы (трансаминазы) играют важную роль в белковом обмене, катализируя перенос аминогруппы от соответствующих аминокислот на кетокислоты с образованием новых кето- и аминокислот без образования свободного аммиака.

У животных клиническое значение имеют две аминотрансферазы: **аспартатаминотрансфераза** ((КФ 2.6.1.1); сокращенное обозначение: **АСТ** (рус.), **АсАТ** (рус.), **AST** (англ.)) и **аланинаминотрансфераза** ((КФ 2.6.1.2); сокращенное обозначение: **АЛТ** (рус.), **АлАТ** (рус.), **ALT** (англ.)).

Так как **АСТ** присутствует во всех тканях тела, этот органонеспецифический фермент может быть использован как индикатор разрушения клеток в различных тканях. Особенно высока концентрация данного фермента в мышцах (скелетные, сердечная), что делает определение активности АСТ наиболее важным в диагностике повреждений именно этого типа тканей (миозиты, беломышечная болезнь у молодняка жвачных, поражение миокарда у собак).

Увеличение уровня сывороточной АСТ также наблюдают при болезнях печени у животных всех видов, хотя нужно помнить, что такое повышение не является специфичным признаком поражения этого органа.

Определение уровня сывороточной **АЛТ** имеет важное значение в диагностике болезней печени у собак, кошек и приматов, так как в гепатоцитах животных этих видов концентрация АЛТ очень высока. При повреждении клеток цитоплазматическая АЛТ выходит во внеклеточное пространство и далее в кровь, где ее концентрация заметно повышается. Увеличение активности сывороточной АЛТ прямо пропорционально количеству поврежденных клеток. Если повреждение незначительное, то и активность АЛТ в крови повышается незначительно. При умеренном повреждении печени уровень фермента в крови возрастает от 3 до 8 раз. При тяжелом некрозе печени наблюдается более чем восьмикратное увеличение сывороточной АЛТ.

У животных других видов (лошади, овцы, свиньи, крупный рогатый скот) определение активности АЛТ в крови в диагностике болезней печени имеет меньшее значение, так как у них концентрация АЛТ в гепатоцитах сравнительно небольшая.

Период полураспада сывороточной АЛТ составляет от 2 до 5 часов. Если печень подверглась кратковременному однократному воздействию вредного фактора (острое, преходящее повреждение), то уровень АЛТ в крови быстро вернется к нормальным значениям. При хронических прогрессирующих болезнях печени высокий уровень АЛТ сохраняется длительное время. Если активность АЛТ в крови уменьшается наполовину каждые 1...2 дня, то это следует рассматривать как благоприятный прогностический признак.

Гемолиз может привести к значительному завышению результатов, так как концентрация АЛТ в эритроцитах примерно в 6 раз выше, чем в плазме.

Схемы биохимического исследования крови в большинстве случаев предусматривают одновременное определение АСТ и АЛТ. Иногда рассчитывают соотношение между ними (АСТ/АЛТ) – так называемый коэффициент де Ритиса. Преобладающий подъем активности АСТ сопровождается увеличением этого коэффициента, что с большей долей вероятности указывает на поражение мышц. Преобладающий подъем активности АЛТ сопровождается снижением коэффициента, что более характерно для поражения печени.

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА (КФ 1.1.1.27)

Сокращенное обозначение: **ЛДГ** (рус.), **LDH** (англ.).

Лактатдегидрогеназа является гликолитическим ферментом и катализирует обратимое превращение молочной кислоты в пировиноградную.

ЛДГ содержится в клетках всех тканей и органов организма животных (печень, легкие, мышцы, почки, сердце, лимфорегикулярная ткань).

Данный фермент имеет несколько изоферментов, распределение которых по тканям хорошо изучено у человека, чего нельзя сказать о животных.

Поскольку этот внутриклеточный фермент очень широко распространен в тканях организма и в лабораторной ветеринарной практике в большинстве случаев определяют общую активность ЛДГ, повышение данного фермента не может являться специфическим признаком поражения того или иного органа или ткани. Гиперферментемия в данном случае лишь свидетельствует об интенсивном распаде клеток и требует дополнительного определения других биохимических показателей для уточнения локализации патологического очага.

Материалом для исследования является сыворотка или плазма крови. При исследовании плазмы важно учитывать, что гепарин и оксАЛТы для стабилизации крови использовать не рекомендуется, так как они ингибируют ЛДГ. Высокая концентрация иммуноглобулинов и мочевины также подавляет активность фермента.

К повышению уровня ЛДГ может приводить длительная задержка отделения сыворотки от кровяного сгустка.

Активность ЛДГ в эритроцитах более чем в 100 раз превышает таковую в плазме крови. Данное обстоятельство делает абсолютно бессмысленным определение общей активности данного фермента даже при слабом гемолизе.

В норме незначительное повышение активности ЛДГ в крови бывает при беременности, у новорожденных животных, а также после физических нагрузок.

СОРБИТОЛДЕГИДРОГЕНАЗА (КФ 1.1.1.14)

Сокращенное обозначение: **СДГ** (рус.), **SDH** (англ.).

Сорбитолдегидрогеназа - внутриклеточный фермент, окисляющий 6-атомный спирт сорбит до D-фруктозы, которая затем может включаться в процесс гликолиза.

Определяют активность фермента в сыворотке или гепаринизированной плазме без гемолиза.

СДГ в высокой степени специфична для печени. В сыворотке крови у здоровых животных активность очень низкая, либо вовсе не определяется.

Повышение активности отмечают при повреждении клеток печени. Также возможно повышение активности при поражении почек.

Фермент нестабилен. Разрушается при 4°С каждые сутки на 25%.

КРЕАТИНКИНАЗА (креатинфосфокиназа) (КФ 2.7.3.2)

Сокращенное обозначение: **КК** (рус.), **КФК** (рус.), **СК** (англ.).

Креатинкиназа – магнийзависимый фермент, катализирующий обратимое фосфорилирование креатина в креатинфосфат при помощи аденозинтрифосфата.

КК играет важную роль в энергетическом обмене и содержится преимущественно в цитоплазме и митохондриях миокарда, скелетной мускулатуры и ткани мозга.

В сыворотку крови 98% фермента поступает из скелетных мышц.

Фермент является разнородным белком, состоящим из 2-х типов субъединиц – В (от англ. *brain*) и М (от англ. *muscle*). В соответствии с их комбинациями выделяют три изофермента: ММ (содержится в скелетных мышцах и миокарде), ВВ (преимущественно в мозге и гладких мышцах) и МВ (в сердечной мышце). Изоферменты различаются по физико-химическим и иммунологическим свойствам.

Повышение активности отмечают при поражении скелетных мышц (миозиты, травмы, дистрофия), при инфаркте миокарда у собак, при гипотиреозе.

К увеличению активности также могут привести внутримышечные инъекции, тяжелые мышечные нагрузки, судороги, повреждение тканей мозга, хирургические операции.

Снижение активности не имеет практического значения, отражая либо малую мышечную массу, либо недостаточную двигательную активность.

Фермент нестабилен при любых условиях хранения. Активность может подавляться при гемолизе из-за наличия в эритроцитах аденилатциклазы. Нужно максимально быстро отделять сыворотку от сгустка. Если нет возможности сразу провести исследование, то сыворотку можно ненадолго заморозить. При хранении в холодильнике при 4°С активность быстро падает, но ее можно восстановить внесением цистеина.

Исследуемые образцы необходимо беречь от света.

γ-ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗА (γ-глутамилтрансфераза) (КФ 2.3.2.2)

Сокращенное обозначение: **ГГТП** (рус.), **ГГТФ** (рус.), **GGT** (англ.).

γ-глутамилтранспептидаза катализирует реакцию переноса γ-глутамильного остатка какого-либо олигопептида на аминокислоту, другой пептид или воду.

В наибольшей концентрации данный фермент содержится в почках, поджелудочной железе, печени, желчных ходах, селезенке, тонком кишечнике. В эритроцитах ГГТП отсутствует, но гемолиз дает ложное завышение результата. Сывороточная ГГТП почти полностью обусловлена печенью.

Увеличение активности ГГТП является очень специфичным и характерным признаком нарушения оттока желчи у всех видов домашних животных. Для холестаза повышение ГГТП даже более информативно, чем ЩФ. При данной патологии активность ГГТП повышается позже, чем активность ЩФ, но поднимается выше (иногда в десятки раз), чем уровень ЩФ и держится дольше.

Также иногда отмечают многократное повышение активности ГГТП при остром панкреатите.

Понижение активности наблюдают при декомпенсированном циррозе печени.

АЛЬДОЛАЗА (КФ 4.1.2.13)

Альдолаза – фермент, катализирующий превращение фруктозо-1,6-дифосфата в дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат в процессе гликолиза. Фермент играет важнейшую роль в энергетическом обмене.

Альдолаза содержится во всех тканях и органах. Наибольшая активность фермента отмечена в скелетных мышцах, миокарде и печени.

Значительное повышение активности отмечают при острых гепатитах, травмах скелетной мускулатуры и больших физических нагрузках у лошадей, поражении миокарда.

Описаны случаи резкого повышения активности при кетозе у коров.

Гемолизованные образцы для исследования не пригодны, так как концентрация фермента в эритроцитах превышает таковую в плазме более чем в 100 раз.

ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗА (КФ 3.4.1.1)

Сокращенное обозначение: **ЛАП** (рус.).

Лейцинаминопептидаза – фермент, катализирующий расщепление полипептидов начиная с N-конца с образованием свободных аминокислот.

Сывороточную активность ЛАП в клинической лабораторной практике определяют в основном для подтверждения гепатобилиарной патологии. ЛАП имеет примерно такое же клиническое значение, как и щелочная фосфатаза. Однако активность ЛАП при заболеваниях костной ткани практически не меняется. Поэтому определение ЛАП используется для дифференциальной диагностики заболеваний гепатобилиарной системы и костной ткани, когда повышена активность щелочной фосфатазы.

Уровень ЛАП значительно выше всего повышается при механической желтухе. При других заболеваниях печени, например при гепатите или циррозе, ее активность повышается в значительно меньшей степени.

Иногда повышение активности ЛАП наблюдают при панкреатите, нефрите.

ХОЛИНЭСТЕРАЗА

Холинэстеразы – ферменты класса гидролаз, расщепляющие различные эфиры холина с образованием холина и соответствующих кислот. В крови животных различают два типа фермента: **ацетилхолинэстераза (АХЭ**, «истинная холинэстераза», КФ 3.1.1.7), локализуемая в нервной ткани и в эритроцитах, и **холинэстераза (ХЭ** (рус.), **ChE** (англ.), «неспецифическая», или псевдохолинэстераза, КФ 3.1.1.8), которая содержится практически во всех тканях и в плазме.

Для ветеринарных специалистов наибольший интерес представляет именно холинэстераза (ХЭ), которая синтезируется в печени.

Гипохолинэстераземия, как правило, характерна для тяжелых заболеваний печени, отражает вовлечение в процесс ее паренхимы и снижение синтетической способности гепатоцитов. Степень снижения активности фермента в плазме соответствует тяжести и распространенности поражений печеночных клеток.

Снижение активности сывороточной ХЭ наблюдают при острых и хронических гепатитах, циррозе, застойной печени при сердечной недостаточности. При обтурационной желтухе, если не поражаются гепатоциты, активность ХЭ не меняется.

Иногда активность ХЭ определяют в хирургической практике перед операциями. Благодаря своевременному обнаружению низкой ее активности удастся избежать осложнений от применения миорелаксантов (дитилин) – длительной миорелаксации и апноэ.

Ложнозавышенные значения активности ХЭ можно наблюдать при исследовании плазмы крови, если в качестве антикоагулянта использовался натрия цитрат.

α -АМИЛАЗА (диастаза) (КФ 3.2.1.1.)

α -Амилаза катализирует гидролиз α -1,4-глюкозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до мальтозы, декстринов и других полимеров.

В крови у животных присутствует кишечная, панкреатическая амилаза, а также печеночная. У некоторых животных (свиньи) присутствует амилаза из слюнных желез.

Увеличение амилазной активности крови чаще ассоциируется с острым панкреатитом.

Амилаза является низкомолекулярным ферментом, поэтому она интенсивно выходит в кровь уже при развитии отека железы. При панкреатитах уровень амилазы в крови быстро растет (в течение нескольких часов), но и быстро приходит в норму при угасании патологического процесса.

При экспериментальном панкреатите у собак максимальная амилазная активность наблюдалась между 24 и 48 часами после повреждения. Активность амилазы возрастала в среднем в 8 раз.

В случаях спонтанного панкреатита, подтвержденного гистологическим исследованием, амилазная активность возростала в среднем в 7 раз выше нормы.

Из крови амилаза отфильтровывается в клубочковом аппарате почек, реабсорбируется и инактивируется в эпителии почечных канальцев. Этот факт объясняет возрастание амилазы у животных с хронической почечной недостаточностью. У собак при почечной недостаточности наблюдают увеличение активности сывороточной амилазы в 2...4 раза.

Повышение активности амилазы в крови наблюдают также при воспалении слюнных желез, иногда при кишечной непроходимости, перитоните, холецистите, холангите, обтурации желчных ходов.

Заниженные значения активности амилазы можно наблюдать при исследовании плазмы крови, если в качестве антикоагулянта использовался оксАЛТ или цитрат натрия.

ЛИПАЗА (панкреатическая липаза) (КФ 3.1.1.3)

Липаза поджелудочной железы – пищеварительный фермент, относящийся к классу гидролаз.

Панкреатическая липаза синтезируется в поджелудочной железе и выделяется в просвет двенадцатиперстной кишки и в тонкий кишечник, где расщепляет жиры корма – триглицериды – на глицерин и высшие жирные кислоты.

Увеличение уровня липазы в крови чаще ассоциируется с острым панкреатитом. Липаза – высокомолекулярный фермент, который интенсивно поступает в кровь при более тяжелых поражениях органа, сопровождающихся гибелью клеток.

Активность липазы начинает повышаться в течение первых 24 часов после начала заболевания и достигает пика на 2...5 сутки.

Панкреатит у собак подтверждается более чем трехкратным повышением активности фермента. Однако нормальное содержание не исключает наличия воспаления поджелудочной железы. И, напротив, повышение показателей при отсутствии клинических симптомов заболевания не указывает на панкреатит у животного.

При хроническом панкреатите уровень липазы и амилазы повышается не очень сильно, а при некрозе ПЖЖ – снижается.

При заболеваниях почек, сниженной скорости клубочковой фильтрации активность липазы может повышаться в 2...3 раза.

Лечение кортикостероидами может вызвать повышение активности сывороточной липазы до 5 раз по сравнению с нормой. При этом гистологически признаки панкреатита не подтверждаются.

ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА (К.Ф. 1.4.1.2)

Сокращенное обозначение: ГлДГ, ГТДГ.

Глутаматдегидрогеназа – митохондриальный фермент, катализирующий превращение глутаминовой кислоты в α -кетоглутаровую и аммиак.

Наивысшая активность данного фермента у животных обнаруживается в печени и почках. В незначительных количествах выявляется в нервной ткани, скелетных мышцах, миокарде и молочной железе.

ГлДГ в основном локализуется в митохондриях и выход его в кровь происходит при тяжелых повреждениях печеночных клеток. Активность умеренно повышается при острых паренхиматозных поражениях печени и более резко – при хронических. При экспериментальном отравлении лошадей четыреххлористым углеродом активность фермента возросла более чем в 70 раз.

Исследование активности глутаматдегидрогеназы часто проводят в комплексе с другими ферментами, характеризующими патологию печени. Для оценки патологического процесса в печени иногда используют коэффициент, представляющий отношение суммы активности АСТ и АЛТ к активности ГлДГ. При острых гепатитах он обычно повышен, при хронических и закупорке желчных путей – понижен.

АРГИНАЗА (L-аргинин-уреогидролаза) (К.Ф.3.5.3.1)

Аргиназа – фермент, катализирующий расщепление аргинина на орнитин и мочевины, завершая этим цикл превращения азота аминокислот в мочевины.

Наиболее высока концентрация аргиназы в печени млекопитающих. Также данный фермент содержится в молочной железе, головном мозге, меньше – в слизистой оболочке кишечника, почках, семенниках. Следы аргиназы найдены во всех тканях. В печени птиц аргиназа не обнаружена.

Определение сывороточной аргиназы имеет значение в диагностике печеночного некроза. Аргиназа является митохондриальным ферментом, следовательно, повышение ее активности в крови наблюдают при уже достаточно тяжелых поражениях печени у лошадей, свиней, жвачных животных.

При гепатонекрозе активность аргиназы в крови снижается значительно быстрее, чем активность АСТ или АЛТ. Различия в изменении активности этих ферментов в крови могут помочь в определении характера повреждения органа. Если наблюдается длительное повышение активности и аргиназы, и трансаминаз, то, вероятнее всего, присутствует прогрессирующий некроз. Если наблюдаются нормальные значения сывороточной аргиназы и повышенные значения трансаминаз после значительного повышения всех этих ферментов, то это свидетельствует о затухании некротического процесса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДГ – Алкогольдегидрогеназа
АЛТ – Аланинаминотрансфераза
АСТ – Аспартатаминотрансфераза
АЦ – Активный центр фермента
ГГТП (ГГТ) – γ -глутамилтранспептидаза (γ -глутамилтрансфераза)
ГлДГ – Глутаматдегидрогеназа
КК (КФК) – Креатинкиназа (креатинфосфокиназа)
КФ – Кислая фосфатаза
ЛАП – Лейцинаминопептидаза
ЛДГ – Лактатдегидрогеназа
ОКТФ – Орнитинкарбамоилтрансфераза
СДГ – Сорбитолдегидрогеназа
СИ – Международная система единиц
ХЭ – Холинэстераза
ЩФ – Щелочная фосфатаза
Е (U) – Международная единица активности фермента
IUB – Международный Совет Биохимиков

ЛИТЕРАТУРА

Основная:

1. Биохимия печени и лабораторная оценка ее физиолого-биохимического состояния : учебно-методическое пособие / О. С. Белоновская [и др.]. – М. : СПбГАВМ, 2014. – 116 с.
2. Зайцев, С. Ю. Биохимия животных / С. Ю. Зайцев, Ю. В. Конопатов. –СПб. : Лань, 2005. – 384 с.
3. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. – Минск : Беларусь, 2000. – 2 т.
4. Кондрахин, И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И. П. Кондрахин. – М. : КолосС, 2004. – 520 с.
5. Медведева, М. А. Клиническая ветеринарная лабораторная диагностика / М. А. Медведева. – М. : Аквариум Принт, 2013. – 416 с.
6. Мейер, Д. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика / Д. Мейер, Дж. Харви. – М. : Софион. 2007. – 456 с.
7. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики : справочник / под ред. проф. И. П. Кондрахина. – М. : КолосС, 2004. – 520 с.
8. Практикум по клинической лабораторной диагностике : учебно-методическое пособие / Л. Н. Кирпиченок [и др.] – Витебск : ВГМУ, 2011. – 175 с.
9. Холод, В. М. Клиническая биохимия : учебное пособие : в 2-х ч. / В. М. Холод, А. П. Курдеко. – Витебск : УО ВГАВМ, 2005. – 2 ч.
10. Холод, В. М. Справочник по ветеринарной биохимии / В. М. Холод, Г. Ф. Ермолаев. – Минск : Ураджай, 1988. – 168 с.
11. Чечеткин, А. В. Биохимия животных / А. В. Чечеткин. – М. : Высшая школа, 1982. – 511 с.

Дополнительная:

1. Биохимический контроль состояния здоровья свиней : рекомендации для руководителей и специалистов агропромышленного комплекса, врачей ветеринарной медицины, слушателей ФПК, аспирантов, магистрантов, студентов факультета ветеринарной медицины / А. П. Курдеко [и др.]. – Горки : БГСХА, 2013. – 48 с.
2. Губергриц, Н. Б. Клиническая панкреатология / Н. Б. Губергриц, Т. Н. Христинич. – Донецк : Лебедь, 2000. – 416 с.
3. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2002. – 2 т.
4. Медицинские лабораторные технологии и диагностика : справочник : в 2 т. / под. ред. проф. А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – Т. 1 : Медицинские лабораторные технологии. – 656 с.
5. Тимин, О.А. Клиническая биохимия [Электронный ресурс] // Биохимия для студента. – 2008. – Режим доступа : <http://biokhimija.ru/klinicheskajabiohimija.html>. – Дата доступа : 21.04.2019.
6. Хиггинс, К. Расшифровка клинических лабораторных анализов / К. Хиггинс. – 3-е изд. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 376 с.
7. Циммерман, Я. С. Клиническая гастроэнтерология : избранные разделы / Я. С. Циммерман. – М. : ГЭОТАР–Медиа, 2009. – 416 с.
8. Coles, T. Veterinary clinical pathology / T. Coles. – London, 1986. – 486 p.
9. Kaneko, J. J. Clinical biochemistry of domestic animals / J. J. Kaneko, J. Harvey, M. Bruss. – [Philadelphia] : Elsevier, 1997. – 932 p.

КАФЕДРА КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Кафедра клинической диагностики является одной из старейших в академии, основана осенью 1924 года. Ее первым заведующим был магистр ветеринарии, профессор А. Н. Макаревский. В разные годы кафедрой руководили Н.М. Студицкий, А.П. Долгошеев, М. Г. Холод, А. П. Герветовский, П.Я. Конопелько, А.Ф. Могиленко, А.П. Курдеко, И.З. Севрюк, А.Г. Ульянов, Ю.К. Ковалёнок (в настоящее время).

Сотрудники кафедры участвовали в написании первой ветеринарной энциклопедии на белорусском языке, ряда справочников и практических пособий врача ветеринарной медицины, 10 учебников по клинической диагностике и внутренним болезням животных, в числе которых первые и единственные по специальности межгосударственные учебники для студентов, обучающимся по ветеринарным специальностям в России, Беларуси и Казахстане. Многотысячными тиражами изданы монографии по болезням недостаточности у свиней, незаразным болезням молодняка, эндемическим болезням животных, ветеринарной диетологии и микроэлементозам животных.

Научные разработки сотрудников защищены 13 патентами на изобретение, в производство внедрено более 20 ветеринарных препаратов, опубликовано более 60 рекомендаций и 1100 научных работ.

За всё время работы на кафедре выполнены и успешно защищены 6 докторских (И.Г. Арестов, В.А. Телепнев, В.В. Концевенко, А.Ф. Могиленко, А.П. Курдеко, Ю.К. Ковалёнок) и 25 кандидатских диссертаций.

В настоящее время на кафедре клинической диагностики работают 9 преподавателей, из которых 1 доктор ветеринарных наук, профессор; 5 - кандидатов наук из которых 4 имеют ученое звание доцента.

Спектр научно-исследовательских интересов коллектива кафедры связан с патологией обмена веществ у животных, мембранным пищеварением и всасыванием веществ, болезнями пищеварительной и дыхательной систем, болезнями молодняка на промышленных комплексах. Научный коллектив занят разработкой новых методов диагностики, а также препаратов для лечения животных и профилактики болезней.

На кафедре ведется преподавание клинической диагностики, клинической биохимии с эндокринологией, а также внутренних незаразных болезней. Ежегодно по этим дисциплинам проходит обучение около 1000 студентов факультета ветеринарной медицины и более 200 ветврачей-слушателей факультета повышения квалификации ВГАВМ. В учебном процессе, при проведении научно-исследовательской работы и оказании помощи животным, которые поступают в клиники академии, используются современные диагностические приборы и лабораторное оборудование.

Активно проводится привлечение студентов к научно-исследовательской работе. Ежегодно на кафедре выполняются несколько магистерских диссертаций, публикуются статьи с участием студентов.

***По вопросам сотрудничества обращаться: по телефону:
8 (0212) 51-73-41; e-mail: klindiag@vsavm.by***



Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины является старейшим учебным заведением в Республике Беларусь, ведущим подготовку врачей ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарных врачей, провизоров ветеринарной медицины и зооинженеров.

Вуз представляет собой академический городок, расположенный в центре города на 17 гектарах земли, включающий в себя единый архитектурный комплекс учебных корпусов, клиник, научных лабораторий, библиотеки, студенческих общежитий, спортивного комплекса, Дома культуры, столовой и кафе, профилактория для оздоровления студентов. В составе академии 4 факультета: ветеринарной медицины; биотехнологический; повышения квалификации и переподготовки кадров агропромышленного комплекса; международных связей, профориентации и довузовской подготовки. В ее структуру также входят Аграрный колледж УО ВГАВМ (п. Лужесно, Витебский район), филиалы в г. Речице Гомельской области и в г. Пинске Брестской области, первый в системе аграрного образования НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии (НИИ ПВМ и Б).

В настоящее время в академии обучается более 4 тысяч студентов, как из Республики Беларусь, так и из стран ближнего и дальнего зарубежья. Учебный процесс обеспечивают 324 преподавателя. Среди них 167 кандидатов, 33 доктора наук, 159 доцентов и 25 профессоров.

Помимо того, академия ведет подготовку научно-педагогических кадров высшей квалификации (кандидатов и докторов наук), переподготовку и повышение квалификации руководящих кадров и специалистов агропромышленного комплекса, преподавателей средних специальных сельскохозяйственных учебных заведений.

Научные изыскания и разработки выполняются учеными академии на базе Научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии. В его состав входит 2 отдела: научно-исследовательских экспертиз (с лабораторией биотехнологии и лабораторией контроля качества кормов); научно-консультативный.

Располагая современной исследовательской базой, научно-исследовательский институт выполняет широкий спектр фундаментальных и прикладных исследований, осуществляет анализ всех видов биологического материала и ветеринарных препаратов, кормов и кормовых добавок, что позволяет с помощью самых современных методов выполнять государственные тематики и заказы, а также на более высоком качественном уровне оказывать услуги предприятиям агропромышленного комплекса. Активное выполнение научных исследований позволило получить сертификат об аккредитации академии Национальной академией наук Беларуси и Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь в качестве научной организации. Для проведения данных исследований отдел научно-исследовательских экспертиз аккредитован в Национальной системе аккредитации в соответствии с требованиями стандарта СТБ ИСО/МЭК 17025.

Обладея большим интеллектуальным потенциалом, уникальной учебной и лабораторной базой, вуз готовит специалистов в соответствии с европейскими стандартами, является ведущим высшим учебным заведением в отрасли и имеет сертифицированную систему менеджмента качества, соответствующую требованиям ISO 9001 в национальной системе (СТБ ISO 9001 – 2015).

www.vsavm.by

210026, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11, факс (0212) 51-68-38, тел. 53-80-61 (факультет международных связей, профориентации и довузовской подготовки); 51-69-47 (НИИ ПВМ и Б); E-mail: vsavmpriem@mail.ru.

Учебное издание

**Ковалёнок Юрий Казимирович,
Демидович Алексей Петрович,
Курилович Александр Михайлович и др.**

ФЕРМЕНТОДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск Ю. К. Ковалёнок
Технический редактор О. В. Луговая
Компьютерный набор А. В. Напреенко
Компьютерная верстка Т. А. Драбо
Корректор Е. В. Морозова

Подписано в печать 28.01.2020. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Ризография.
Усл. печ. л. 2,0. Уч.-изд. л. 1,81. Тираж 55 экз. Заказ 2011.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 51-75-71.
E-mail: rio_vsavm@tut.by
<http://www.vsavm.by>