

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**ОБМІН АДЕНІЛОВИХ НУКЛЕОТИДІВ У НИРКАХ ЩУРІВ ЗА
УМОВ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ АЦЕТАМІНОФЕНОМ НА ТЛІ
БІЛКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ**

**Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)**

Виконала:

студентка 6 курсу, 600 групи

Черелюк Елізавета Миколаївна

Керівник:

Кандидат біологічних наук,
доцент **Волощук О. М.**

Чернівці – 2023

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню вмісту АТР, АДР, АМР та активності ключових ензимів обміну аденілових нуклеотидів у нирках щурів за умов токсичного впливу ацетамінофену на тлі білкової недостатності.

Встановлено, що у клітинах нирок щурів, які споживали низькопротеїновий раціон (НПР), не змінюється вміст аденілових нуклеотидів та відсутні достовірні зміни активності H^+ -АТР-ази та АМР-дезамінази, проте спостерігається достовірне зниження 5'-нуклеотидазної активності порівняно з показниками контрольних тварин. У клітинах нирок тварин, яким вводили токсичні дози ацетамінофену, спостерігається достовірне зниження вмісту АТР на тлі виснаження пулу АДР та АМР. При цьому зростає АМР-дезаміназна та H^+ -АТР-азна активності у 2 та 1,5 рази відповідно на тлі зниження активності 5'-нуклеотидази майже у 3 рази порівняно з контролем. Максимально виражені зміни вмісту АТР, АМР та H^+ -АТР-азної активності зафіксовано у групи тварин НПР/ТУ, проте достовірної зміни активності 5'-нуклеотидази й АМР-дезамінази порівняно з групою ТУ не виявлено. Отже, наслідком встановлених нами змін обміну аденілових нуклеотидів може бути формування енергетичного дисбалансу, що в свою чергу може призводити до порушення функціональної активності нирок.

Ключові слова: нирки, білкова недостатність, ацетамінофен, аденілові нуклеотиди, H^+ -АТР-аза, АМР-дезаміназа, 5'-нуклеотидаза

ABSTRACT

The master's work is devoted to the study of the content of ATP, ADP, AMP and the activity of key enzymes for the exchange of adenyl nucleotides in the kidneys of rats under the conditions of toxic exposure to acetaminophen against the background of protein deficiency.

During the experiment, it was found that in the kidney cells of rats that consumed a low-protein diet (LPD), the content of adenyl nucleotides does not change and there are no significant changes in the active H^+ -ATP-ase and AMP-deaminase, however, there is a significant decrease in 5'-nucleotidase activity compared to the control animals (K). In kidney cells of animals injected with toxic doses of acetaminophen (TI), a significant decrease in ATP content is observed, against the background of depletion of the ADP and AMP pool. At the same time, AMP-deaminase and H^+ -ATP-ase activity increase by 2 and 1.5 times against the background of a decrease in the activity of 5'-nucleotidase by almost 3 times compared to the control (K). The most pronounced changes in the content of ATP, AMP and H^+ -ATP-ase activity were recorded in the group of animals of LPD/TI, however, no significant changes in the content of ADP and the activity of 5'-nucleotidase and AMP-deaminase were detected compared to the TI group. Therefore, the consequence of the changes in the exchange of adenyl nucleotides established by us may be the formation of an energy imbalance, which in turn can lead to a violation of the functional activity of the kidneys

Keywords: kidney, protein deficiency, acetaminophen, adenyl nucleotides, ATP, ADP, AMP, H^+ -ATP-ase, AMP-deaminase, 5'-nucleotidase.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Е.М. Черелюк

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1 Шляхи метаболізму та механізми токсичності ацетамінофену	7
1.2 Особливості обміну пуринів у нормі та за умов патології	11
1.3 Шляхи використання аденілових нуклеотидів	14
1.4 Характеристика ензимів, які задіяні в обміні аденілових нуклеотидів.....	16
1.5 Вплив аліментарного дефіциту протеїну на стан організму	21
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	25
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	31
ВИСНОВКИ	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	Ошибка! Закладка не определена.
ДОДАТКИ.....	Ошибка! Закладка не определена.

ВСТУП

На сьогоднішній день ацетамінофен вважається одним з найпоширеніших безрецептурних медикоментозних засобів, який проявляє жарознижувальний, знеболюючий та незначний протизапальний ефекти [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Даний медикоментозний препарат часто використовують без дотримання рекомендованих доз, оскільки ацетамінофен є безрецептурним препаратом, що призводить до розвитку токсичності [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Відомо, що при передозуванні ацетамінофен проявляє токсичний вплив внаслідок утворення проміжного метаболіту – N-ацетил-*p*-бензохіноніміну (NAPQI). За нормальних умов цей метаболіт знешкоджується за допомогою глутатіону, проте при інтоксикації ацетамінофеном запаси глутатіону виснажуються та утворюються NAPQI-білкові аддукти, що в свою чергу, призводить до посилення вільнорадикальних процесів і розвитку окисного стресу та загибелі клітин [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Токсичність ацетамінофену є найпоширенішою причиною гострої печінкової недостатності, проте за умов передозування цим медикоментозним препаратом можливий розвиток токсичного ураження нирок. Робота нирок великою мірою залежить від енергетичного забезпечення клітин, оскільки цей орган здійснює життєво важливі функції та відіграє гомеостатичну роль в організмі. За умов нефротоксичного впливу ацетамінофену ефективність функціонування системи енергообміну клітин є вирішальною для забезпечення функціональної активності нирок. Варто зазначити, що молекулярні механізми, пов'язані з ацетамінофен-індукованою нефротоксичністю, на сьогодні не до кінця відомі.

Важливим показником енергетичного статусу клітин є вміст у них аденілових нуклеотидів, а саме АТФ, АДФ та АМФ, оскільки вони забезпечують взаємозв'язок між енергоутворюючими й енергозатратними процесами, відіграючи ключову роль у клітинному метаболізмі [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Ключовим ензимом обміну аденілових

нуклеотидів є H^+ -АТР-аза, яка являє собою V комплекс електронтранспортного ланцюга мітохондрій. Варто відзначити, що H^+ -АТР-аза каталізує як пряму реакцію синтезу АТР з АDP та неорганічного фосфату, так і зворотню реакцію гідролізу АТР [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Відомо, що механізм підтримання аденілатного пулу клітин в більшості тканин взаємопов'язані саме з метаболізмом АМР [Ошибка! Источник ссылки не найден.], тому зміна рівня АМР є інформативним маркером стану енергетичного обміну клітини. Важливими ензимами, які задіяні в катаболізмі АМР, є 5'-нуклеотидаза, яка здійснює процес гідролізу нуклеотидів, в тому числі й АМР, до відповідних нуклеозидів та P_i , а також АМР-дезаміназа, яка каталізує реакцію перетворення АМР до ІМР та NH_3 [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Саме тому *метою роботи* було дослідження вмісту аденілових нуклеотидів та ключових ензимів обміну аденілових нуклеотидів в нирках щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності.

Відповідно були поставлені наступні *завдання*:

1. Визначити вміст АТР, АDP, АМР та H^+ -АТР-азну активність в мітохондріальній фракції нирок щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном на тлі білкової недостатності.
2. Дослідити активність 5'-нуклеотидази та АМР-дезамінази в цитозольній фракції нирок щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном на тлі білкової недостатності.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Шляхи метаболізму та механізми токсичності ацетамінофену

Ацетамінофен (N-ацетил-*p*-амінофенол, парацетамол) – синтетичний нестероїдний протизапальний медикоментозний засіб, який проявляє знеболюючий та жарознижувальний ефекти **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Парацетамол – це один з найпоширеніших безрецептурних препаратів для полегшення жару та болю. Як діюча речовина ацетамінофен є в складі як моно-, так і багатокомпонентних медикоментозних препаратів. Парацетамол призначають вагітним та годуючим жінкам, дітям, людям з бронхіальною астмою й виразками шлунка, тобто тим, кому протипоказані стероїдні протизапальні препарати **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

Парацетамол приймають перорально або внутрішньовенно. Добова доза ацетамінофену не повинна перевищувати 4000 мг, а максимальна разова доза – 1000 мг **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. На сьогодні відомо, що за умов дотримання рекомендованих доз ацетамінофен є безпечним та ефективним засобом, проте за умов недотримання рекомендованих доз може призвести до побічних ефектів **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Сучасні дослідження свідчать про можливість розвитку нефротоксичності та гепатотоксичності за дії цього медикоментозного засобу в великих дозах **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

Процеси всмоктування парацетамолу відбуваються переважно в дванадцятипалій кишці. Далі ацетамінофен за допомогою білків плазми транспортується до печінки, де здійснюється його метаболізм **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. На сьогодні відомо про декілька шляхів метаболізму ацетамінофену. Цей засіб може метаболізуватися шляхом кон'югації з глюкуроною (40-67%) або сульфатною кислотою (20-46%) за допомогою уридин-глюкуронілтрансферази або сульфотрансферази відповідно **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. В результаті цих

реакції утворюється проміжний метаболіт – *p*-амінофенол, який перетинає мозково-кров'яний бар'єр та за допомогою аміду жирних кислот метаболізується в *N*-ацилфеноламін (AM404) **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Утворені проміжні метаболіти є нетоксичними для організму людини й здатні виводитись із організму з сечею **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Окрім того, від 5 до 15% ацетамінофену за дії цитохромів P450, особливо таких ізоформ як CYP2E1 та CYP1A2, підлягає окисно-відновній реакції *N*-гідроксилювання в клітинах печінки. В результаті утворюється *N*-ацетил-*p*-бензохінонімін (NAPQI) – токсичний проміжний метаболіт ацетамінофену **[Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. В літературі згадується, що утворення цього токсичного метаболіту можливе й в клітинах нирок, оскільки там також наявний CYP2E1 **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Нейтралізація NAPQI здійснюється в результаті кон'югації з сульфгідрильними групами глутатіону за допомогою ензиму глутатіон-S-трансферази **[Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. З печінки утворений кон'югат транспортується до нирок, де відбувається його розщеплення за дії *N*-ацетилтрансферази й утворення меркаптурової кислоти, яка виводиться з організму з сечею. Окрім того, до 3% парацетамолу виводиться з організму людини в незміненому вигляді з сечею **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

При передозуванні ацетамінофеном, метаболічні шляхи сульфатації та глюкуронізації виснажуються і тому основна частка лікарського засобу метаболізується саме шляхом *N*-гідроксилювання, що призводить до накопичення токсичного проміжного метаболіту. Проте NAPQI не здатен повністю нейтралізуватися глутатіоном, оскільки його запаси також виснажуються при збільшенні концентрації ацетамінофену **[Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Як результат, відбувається інтенсивне утворення стійких NAPQI-білкових аддуктів – продуктів реакції NAPQI із сульфгідрильними групами білків.

Слід зазначити, що утворення NAPQI-білкових аддуктів з мітохондріальними протеїнами наразі розглядається як основний механізм токсичної дії ацетамінофену, оскільки призводить до енергетичного виснаження, а також загибелі клітин внаслідок розвитку окисного стресу та відповідно дисфункції мітохондрій **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

Відомо, що при взаємодії NAPQI з білками дихального ланцюга мітохондрій клітин печінки, а особливо з АТР-синтазою, нормальне функціонування електронотransпортного ланцюга порушується й відбувається посилене утворення вільних радикалів, зокрема супероксиду **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. При взаємодії цього вільного радикалу з оксидом азоту утворюються токсичний пероксинітрит (ONOO^-). Зазвичай нейтралізація активних форм кисню, в тому числі й пероксинітриту, відбувається в результаті кон'югації з глутатіоном. Тому за умов інтоксикації ацетамінофеном відбувається накопичення токсичних вільних радикалів, оскільки пул глутатіону за таких умов виснажується **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Це в свою чергу призводить до посилення вільнорадикального окиснення протеїнів, у тому числі й цитозольного тіоредоксину. Як результат, ASK1 спільно з фосфорилазами MLKL3 призводить до активації c-Jun-N-термінальної кінази (JNK) **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Фосфорильована JNK транспортується до мітохондрій, де відбувається її зв'язування з зовнішньою мембраною та активація процесів, які призводять до дисфункції дихального ланцюга та окисного стресу, зокрема утворення пероксинітриту. Ці процеси активують перехідну пору мітохондріальної проникності (MPT) **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**, що призводить до вивільнення мітохондріальних білків, таких як цитохром c, ендонуклеаза G та апоптоз-індукуючий фактор (AIF). Ендонуклеаза G й AIF транслокуються в ядро клітини, де запускають процес фрагментації ядерної

ДНК й, відповідно, загибель клітин **[Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

Варто зазначити, що описані вище ознаки розвитку гепатотоксичності викликані ацетамінофеном, такі як активація с-Jun-N-термінальної кінази, транслокація до мітохондрій фосфорильованої JNK, активація перехідної пори мітохондріальної проникності, не зовсім характерні для клітин нирок **[Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Однак, в проксимальних ниркових каналцях все ж було виявлено в невеликій кількості NAPQI-білкові аддукти та CYP2E1, що підвищує імовірність того, що мінімальна активація с-Jun-N-термінальної кінази все ж може відбуватися в цій ділянці нирок. Як підтвердження цьому гістологічний аналіз нирок при передозуванні парацетамолом демонструє гострий некроз саме в цій ділянці **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. До того ж, сучасні дослідження демонструють, що ацетамінофен здатен пригнічувати роботу дихального ланцюга в клітинах нирок гризунів **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Окрім того, порушення функціонування мітохондрій, викликане інтоксикацією ацетамінофеном, призводить й до різних метаболічних змін. Відомо, що у відповідь на окисний стрес, індукований ацетамінофеном, порушується робота циклу трикарбонових кислот та β -окислення жирних кислот, що призводить до виснаження клітинних енергетичних запасів й активації гліколізу як основного постачальника АТФ **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

На сьогодні питання щодо механізму дії парацетамолу залишається відкритим. Цей медикаментозний препарат здатен викликати жарознижувальний та знеболюючий ефект шляхом блокування синтезу простагландинів з арахідонової кислоти завдяки інгібуванню циклооксигеназ (COX-1 і COX-2). Проте інтенсивність інгібування є невисокою порівняно з іншими нестероїдними протизапальними засобами **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. До того ж, інгібування циклооксигенази за дії ацетамінофену відбувається в місцях з дуже низьким

рівнем пероксидів, а саме в мозку. Саме це пероксидно-опосередковане інгібування COX пояснює, чому парацетамол не активний в осередку запалення, де концентрація пероксиду дуже висока **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Також відомо, що одна з ізоформ циклооксигенази, а саме COX-3, характеризується найвищою чутливістю до ацетамінофену. Проте з часом стало відомо, що COX-3 не характерний для людей. Саме тому науковці дійшли до висновку, що інгібування COX не є основним механізмом анальгезії ацетамінофену **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

На сьогодні відомо, що мішень дії парацетамолу знаходиться в межах нервової системи, а також цей медикоментозний препарат немає периферичної дії **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**, тому як головний механізм знеболюючого ефекту ацетамінофену розглядають вплив на больові рецептори головного мозку (TRPV1 та CB1) N-ацилфеноламіну. Проте в сучасній літературі висувуються припущення, що парацетамол здатен викликати анальгезивний ефект шляхом активації больових рецепторів спинного мозку **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Окрім того, багато досліджень вказують на те, що знеболюючі ефекти парацетамолу пов'язані з активацією низхідних серотонінергічних шляхів нервової системи, а один з метаболітів ацетамінофену – N-ацилфеноламін може активувати канабіноїдну систему, знижуючи інтенсивність деградації або поглинання анандаміду **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

2. Особливості обміну пуринів у нормі та за умов патології

Клітинний метаболізм – це послідовні біохімічні реакції, які суворо регулюються та спрямовані на поповнення пулу субстратів, необхідних для основних клітинних процесів. Одними з таких субстратів є пурини **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Окрім своєї основної функції – утворення молекул ДНК та РНК, пуринові нуклеотиди, такі як гуанозин-5'-трифосфат (GTP) й

аденозин-5'-трифосфат (АТР), відіграють важливу роль у внутрішньоклітинній передачі сигналів та підтримці енергетичного балансу клітин. Окрім того, пуринові нуклеотиди можуть входити до складу більш складних біомолекул та відігравати роль кофакторів **[Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Саме тому збалансований вміст пуринів необхідний для нормального функціонування клітин **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

Метаболізм пуринів поділяється на три шляхи:

- біосинтетичний шлях *de novo* (DNPB), під час якого утворюється інозинмонофосфат (ІМР);
- катаболічний шлях, кінцевим продуктом якого є сечова кислота;
- шлях відновлення або реутилізації (PSP), під час якого відбувається перетворення аденіну, гуаніну та гіпоксантину відповідно на АМР, ГМР та ІМР **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

На сьогодні відомо, що пуринові нуклеотиди синтезуються з глюкози або амінокислот переважно під час G1 і S фази клітинного циклу, з метою поповнення пулу нуклеотидів для процесу проліферації. Відповідно в непроліферуючих клітинах, яким потрібна менша кількість нуклеотидів, відбуваються процеси реутилізації та катаболізму пуринів **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Отже, шлях відновлення підтримує вміст пуринових нуклеотидів за нормальних фізіологічних умов, а шлях біосинтезу *de novo* – під час росту клітин, а також у неопластичних клітинах **[Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

Основним місцем синтезу пуринів у людини є печінка **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. На відміну від піримідинових нуклеотидів, синтез пуринів повністю відбувається в цитоплазмі **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**. Ключовим попередником для біосинтезу пуринів *de novo* є фосфорибозилпірофосфат (PRPP), що синтезується PRPP-синтетазою (PRS), яка використовує як субстрати рибозо-5-фосфат із пентозофосфатного

шляху та АТР. Відомо, що існує шість ензимів, які каталізують десять послідовних етапів біосинтезу інозин 5'-монофосфату (ІМР) з фосфорибозилпірофосфату [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Цими шістьма ензимами є:

1. PRPP-амідотрансфераза (PPAT, EC 2.4.2.14);
2. трифункціональний ензим GART (фосфорибозилгліцинамідсинтетаза (GARS, EC 6.3.4.13)/ фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза (GAR T-фаза, EC 2.1.2.2)/ фосфорибозиламіноімідазолсинтетаза (EC6.S) .3.1));
3. фосфорибозилформілгліцинамідсинтаза (FGAMS, EC 6.3.5.3);
4. біфункціональний ензим PAICS (фосфорибозил аміноімідазолкарбоксилаза (CAIRS, EC 4.1.1.21)/ фосфорибозил аміноімідазолсукцинокарбоксамідсинтетаза (SAICARS, EC 6.3.2.6));
5. аденілосукцинатліаза (ADSL, EC 4.3.2.2);
6. біфункціональний ензим ATIC (5-аміноімідазол-4-карбоксамід рибонуклеотидформілтрансфераза (AICAR Tfase, EC 2.1.2.3)/ ІМР циклогідролаза (IMPCH, EC 3.5.4.10)) [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Шлях біосинтезу пуринів *de novo* є енергоємним та висококонсервативним процесом. Для підтримки цього 10-стадійного ферментативного процесу потрібне надходження багатьох субстратів та кофакторів, які утворюються в інших метаболічних шляхах, таких як пентозофосфатний та гліколітичний шляхи, цикл Кребса, а також обмін амінокислот тощо [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Для утворення однієї молекули ІМР потрібно п'ять молекул АТР, дві молекули форміату та глютаміну, а також по одній молекулі аспартату, гліцину та вуглекислого газу. Таким чином, ці субстрати відіграють вирішальну роль у метаболізмі пуринів, особливо у швидко проліферуючих клітинах [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

IMP є пуриновим проміжним продуктом, який надалі може перетворитись або на аденозин 5'-монофосфат (AMP) або гуанозин 5'-монофосфат (GMP) за дії чотирьох ензимів: аденілосукцинатсинтази (ADSS, EC 6.3.4.4) й аденілосукцинатліази (ADSL, EC 4.3.2.2) для отримання AMP та IMP-дегідрогенази (IMPDH, EC 1.1.1.205) й GMP-синтази (GMPS, EC 6.3.5.2) для отримання GMP [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Варто відзначити, що ці ензими не є характерними лише для шляху біосинтезу *de novo*, оскільки шлях відновлення також залежить від їх діяльності [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Згодом AMP та GTP фосфорилуються у відповідні нуклеозидні ди- або трифосфати [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Катаболізм пуринових нуклеотидів являє собою послідовне їх перетворення на сечову кислоту [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Перший етап каталізується 5'-нуклеотидазами, які каталізують процес перетворення нуклеозидмонофосфатів (AMP, GMP) на нуклеозиди (аденозин, гуанозин) шляхом дефосфорилювання [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Далі аденозин вступає в реакцію гідролітичного дезамінування з утворенням інозину. Дана реакція каталізується аденозиндезаміназою (EC 3.5.4.4). Нуклеозиди, гуанозин та інозин, перетворюються на пуринові основи гуанін та гіпоксантин відповідно за допомогою ензиму пуриннуклеозидфосфорилази (PNP) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Кінцева стадія катаболізму пуринових основ каталізується за допомогою ксантиноксидази (ХО, EC 1.17.3.2), а продуктом реакції є сечова кислота. Варто відзначити, що під час даної реакції утворюються також вільні радикали [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Отже, кінцевим продуктом метаболізму пуринів є сечова кислота. Утворення сечової кислоти відбувається в основному в печінці, кишечнику й інших тканинах та органах, таких як м'язи, нирки та ендотелій судин. За нормальних умов сечова кислота виділяється з сечею під час роботи нирок. Однак процес екскреції сечової кислоти може бути порушений

захворюванням нирок, що призводить до гіперурикемії. Гіперурикемія виникає в результаті підвищення синтезу сечової кислоти та порушення її виведення нирками. Такий стан характеризується підвищенням рівня сечової кислоти в крові, що в свою чергу призводить до відкладання кристалів уратів у нирках. Як правило, гіперурикемія характеризується зростанням концентрації сечової кислоти в крові понад 6,0 мг/дл у жінок та 7,0 мг/дл у чоловіків. Гіперурикемія є ключовим фактором розвитку таких патологій, як подагра, гіперліпідемія, артеріальна гіпертензія, ожиріння та діабет [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Крім того, азотисті основи, які локалізовані в позаклітинному матриксі, а саме гіпоксантин, гуанін й аденін, можуть транспортуватись в клітину для утворення відповідного нуклеотиду. Шлях відновлення здійснюється за рахунок рециркуляції деградованих азотистих основ за допомогою гіпоксантин-гуанінфосфорибозилтрансферази (HPRT, EC 2.4.2.8) та аденінфосфорибозилтрансферази (APRT, EC 2.4.2.7). HPRT – це Mg^{2+} -залежний ензим, який перетворює гіпоксантин в інозин-5'-монофосфат (IMP) та гуанін в гуанін-5'-монофосфат (GMP) шляхом перенесення фосфорибозильної групи з фосфорибозилпірофосфату (PRPP) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Водночас APRT каталізує процес перетворення аденіну в аденозин-5'-монофосфат (AMP) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Таким чином, шлях реутилізації, порівняно з шляхом біосинтезу *de novo*, є швидшим процесом та потребує меншої кількості енергії [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

3. Шляхи використання аденілових нуклеотидів

Аденілові нуклеотиди (AdNs: AMP, ADP, ATP) – це органічні сполуки, до складу яких входять пуринова основа (аденін), рибоза й фосфатна група [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. AdNs є важливими елементами системи біотрансформації енергії клітин, оскільки забезпечують взаємозв'язок між енергоутворюючими та енергозатратними процесами,

відіграючи ключову роль у регуляції обміну речовин [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Головною енергетичною сполукою в організмі є АТР. Реакції гідролітичного розщеплення АТР до АДФ забезпечують потреби клітин в енергії. Окрім того, АТР може утворюватися з АДФ у ряді метаболічних реакцій. За нормальних умов співвідношення АДФ:АТР сягає 1:10, водночас зміна цього співвідношення відображає дисбаланс між процесами утворення та використання АТР [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Сталий рівень аденілових нуклеотидів у клітині підтримується завдяки аденілаткіназам (АК), які каталізують оборотну реакцію трансфосфорилювання двох молекул АДФ в одну молекулу АМФ та АТР. Отже, за умов коли клітина не здатна синтезувати потрібну кількість АТР, АК можуть підтримувати енергетичний баланс завдяки цій реакції. Це явище описав Аткинсон, сформувавши теорію «аденілатного енергетичного заряду». Згідно з цією теорією, більшість клітин підтримують енергетичний заряд (ЕС), визначений згідно рівняння: $ЕС = [(АТР) + 0,5(АДФ)] / [(АТР) + (АДФ) + (АМФ)]$ в межах 0,8–0,9 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Зміна рівня АМФ є найкращим маркером стану енергетичної системи клітини, оскільки завдяки аденілаткіназній реакції відношення АМФ до АТР змінюється як квадрат співвідношення АДФ:АТР [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окрім того, механізми підтримання сталого пулу аденілових нуклеотидів в більшості тканин взаємопов'язані саме з метаболізмом АМФ [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Відомо, що АТР може безпосередньо брати участь в регуляції клітинних сигналів або відігравати роль структурної основи для вторинних месенджерів. Загальновідомим прикладом є пряме регулювання 5'-АМФ-активованої протеїнкінази (АМРК) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. АМРК називають «енергетичними сенсорами клітини», оскільки вони реагують на зниження рівня АТР та зростання АМФ [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Отже, відповідно до своєї ролі датчика

аденілових нуклеотидів, АМРК активується в станах низької клітинної енергії та вимикає анаболічні шляхи, які споживають АТР, та вмикає катаболічні шляхи, які генерують АТР [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окрім того, АТР також є попередником для вторинного месенджера – циклічного АМР (сАМР) за допомогою ензиму аденілатциклази. Утворений сАМР бере участь у багатьох процесах, пов'язаних із транскрипцією генів, регуляцією іонних каналів і метаболізмом [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Аденілові нуклеотиди також впливають на клітинний метаболізм через прямий і непрямий контроль основних метаболічних шляхів. Наприклад, AdN можуть безпосередньо регулювати метаболізм глікогену та глюкози шляхом алостеричної регуляції ензимів, таких як глікогенфосфорилаза та фосфофруктокіназа-1. Крім того, аденілові нуклеотиди опосередковано регулюють метаболізм, контролюючи синтез деяких кофакторів, а саме NAD^+ , NADH , FAD та CoA-SH . Відомо, що зниження рівня АТР *in vitro* призводить до лінійного зниження NAD^+ , тому що для синтезу NAD^+ потрібні АТР і нікотинамідний мононуклеотид (NMN). В свою чергу фосфорибозилпірофосфат (PRPP) використовується як під час синтезу NMN, так і під час синтезу пуринів *de novo* та відновлення пуринів [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Враховуючи, що розвиток патологічного стану у випадку стрес-реакції супроводжується порушенням метаболізму та енергетичного балансу, що може відображатися і на рівні аденіннуклеотидів, то вміст і співвідношення АТР, АDP, АМР у різних органах є важливим інформативним показником [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

4. Характеристика ензимів, які задіяні в обміні аденілових нуклеотидів

1. АМР-дезаміназа

АМР-дезаміназа (AMPD, EC 3.5.4.6) – це тетрамерний ензим класу гідролаз, який бере участь у метаболізмі аденілових нуклеотидів та відіграє

ключову роль в енергетичному обміні клітин, регулюючи рівень аденілатного енергетичного заряду [Ошибка! Источник ссылки не найден.], та іонів амонію, які важливі для протидії кислому рН [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окрім того, ензим бере участь в процесі дезамінування амінокислот [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. AMPD каталізує необоротну реакцію гідролітичного дезамінування AMP до IMP та аміаку [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

AMP-дезаміназа впливає на рівень аденілатного енергетичного заряду завдяки двом механізмам, а саме будучи частиною циклу пуринових нуклеотидів, а також завдяки регулюванню рівноваги аденілаткіназної реакції. Аденілаткіназна реакція – це оборотна реакція, під час якої дві молекули ADP перетворюються на одну АТР та одну AMP [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Ця реакція підтримує сталий рівень аденілових нуклеотидів у клітинах. Утворений АТР використовується в процесах, що потребують енергетичних витрат, тоді як AMP дезамінується до IMP за допомогою AMP-дезамінази. Утворений IMP надходить в пул аденінових нуклеотидів завдяки таким ензимам, як аденілосукцинатсинтетаза та аденілосукцинатліаза. Варто відзначити, що під час реакцій, каталізованих цими ензимами, вивільняється фумарат, який підтримує роботу циклу Кребса [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

За умов зниження активності AMPD відбувається накопичення пулу AMP, що негативно впливає на аденілаткіназну реакцію, зміщуючи рівновагу реакції в бік утворення ADP. Крім того, знижена активність AMPD призводить до інгібування шляху біосинтезу пуринів *de novo* та в кінцевому підсумку – до порушення синтезу білка через нестачу GTP [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окрім того, цей фермент відіграє важливе значення для внутрішньоклітинної регенерації АТР, оскільки цей процес залежить від аденілатного енергетичного заряду клітин. Відомо, що підвищена активність AMP-дезамінази призводить до активації

піруваткінази та фосфофруктокінази, підтримуючи таким чином клітинний метаболізм [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Існує декілька ізоформ АМР-дезамінази, які володіють різними кінетичними властивостями, молекулярною масою та структурою. Ці ізоформи кодуються трьома різними генами: AMPD1, AMPD2 і AMPD3. У людини AMPD1 локалізована в скелетних м'язах (М форма); AMPD2 переважно експресується в мозку, печінці, нирках та селезінці (L форма); AMPD3 зосереджена головним чином в еритроцитах (Е форма) [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Варто відзначити, що у скелетних м'язах АМФ-дезаміназна активність найвища, порівняно з будь-якою іншою тканиною, оскільки цей ензим відіграє важливу роль у підтримці енергетичного балансу клітин під час скорочення м'язів [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

2. 5'-нуклеотидаза

5'-Нуклеотидази (ЕС 3.1.3.5) – це ензими, які каталізують гідролітичне дефосфорилювання 5'-рибонуклеотидів та 5'-дезоксирибонуклеотидів до відповідних нуклеозидів та фосфату [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. 5'-нуклеотидазна активність відіграє вирішальну роль для шляху відновлення пуринів і пуринергічної передачі сигналів і може реалізовуватись як всередині клітини, так і в позаклітинному просторі [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Класифікація 5'-нуклеотидаз здійснюється відповідно до субклітинної локалізації та специфічності ензимів. Відомо, що існує сім ізоформ 5'-нуклеотидази, які локалізуються в різних тканинах та клітинах. П'ять ізоформ є цитоплазматичними (cN-IA, cN-IB, cN-II, cN-III та cdN), одна ізоформа мітохондріальна (mdN) і ще одна розташована на зовнішній плазматичній мембрані (e5'NT) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. На сьогодні добре вивченими є cN-I, cN-II та e5'NT [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Цитозольна 5'-нуклеотидаза I (cN-I) локалізується в скелетних і серцевому м'язах. У людини існує дві ізоформи цитозольної 5'-

нуклеотидази I, а саме cN-IA та cN-IB. Субстратом для cN-IA виступає АМР. У людей ця ізоформа локалізується в скелетних м'язах, серці, мозку, підшлунковій залозі, печінці, яєчках та матці [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Головною функцією ферменту в організмі людини є утворення аденозину в ішемічних або гіпоксичних умовах, що має вирішальне значення для профілактики пошкоджень серця [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. cN-IB мало відрізняється від cN-IA, його субстратом є також АМР. У людей cN-IB локалізується в багатьох тканинах та клітинах [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Цитозольна 5'-нуклеотидаза II (cN-II) є повсюдно експресованим і висококонсервативним ізоферментом, який гідролізує переважно ІМР та GMP [Ошибка! Источник ссылки не найден.], проте субстратом для ензиму виступає й АМР [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Цитозольна 5'-нуклеотидаза II дуже чутлива до змін аденілатного енергетичного заряду. Структурний аналіз показав, що АТР, АДФ є алостеричними активаторами cN-II, водночас інгібітором виступає неорганічний фосфат [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окрім того, відомо, що окиснювальний стрес викликає незворотну інактивацію ферменту [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Підвищена активність ензиму пов'язана з такими патологічними станами, як рак та метаболічно-неврологічні порушення [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. В літературних джерелах вказується, що рівень експресії cN-II в деяких ракових клітинах корелює з клітинною проліферацією [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Екто 5'-нуклеотидаза (e5'NT) – це глікопротеїн, прикріплений до глікозилфосфатидилінозиту (GPI), який функціонує як димер на плазматичній мембрані клітин. Окрім того, 5'-NT являє собою кластер диференціювання (CD) 73 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Варто відзначити, що екто-5'-нуклеотидаза локалізується в різних типах тканин та клітин, де здійснює регуляцію критично важливих функцій [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Головна роль CD73 полягає в регуляції гомеостазу тканин та реакцій на стрес, пошкодження та запалення тканин [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Варто відзначити, що 5'-NT – це основний ензим, який

каталізує реакцію утворення позаклітинного аденозину з АМР. Утворений аденозин здійснює вплив на ряд аденозинових рецепторів (A1R, A2AR, A2BR і A3R), що в свою чергу індукує процеси передачі сигналів. Окрім того, аденозин може транспортуватися всередину клітини за допомогою врівноважених транспортерів нуклеозидів (ENTs) та повторно фосфорилюватися до АМР. На сьогодні більшість досліджень пояснюють фізіологічні функції 5'-нуклеотидаз здатністю контролювати саме позаклітинний пул аденозину та АТР [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Рівень саме цих двох метаболітів відіграє вирішальне значення для запобігання неконтрольованому ушкодженню тканин під час розвитку запальних процесів, шляхом перемикання імунної активації, опосередкованої АТР, на імуносупресію, індуковану аденозином [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окрім того, низький рівень експресії CD73 тісно пов'язаний з різними автоімунними захворюваннями [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

3. H^+ -АТР-аза

АТР-фосфогідролаза H^+ -транспортуюча (H^+ -АТР-аза; ЕС 7.1.2.2), також відома як АТР-аза F-типу (F_1F_0 -АТР-синтаза) – це мембранний багатосубодиничний білковий комплекс, що має молекулярну масу приблизно 550 кДа [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. H^+ -АТР-аза – це V комплекс дихального ланцюга мітохондрій, під час роботи якого утворюється АТР шляхом окисного фосфорилування ADP за допомогою електрохімічної енергії, що генерується протонним градієнтом через внутрішню мембрану мітохондрій [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Реакція відбувається за допомогою обертового механізму, під час якого вільна енергія трансмембранного електрохімічного градієнта іонів перетворюється на вільну енергію фосфорилування АТР з ADP й P_i та навпаки [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Варто відзначити, що H^+ -АТР-аза здатна використовувати як вільну енергію трансмембранного електрохімічного потенціалу для процесу синтезу АТР, так і енергію гідролізу АТР для

перекачування протонів через внутрішню мембрану мітохондрій, тим самим створюючи градієнт електрохімічного потенціалу [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Отже, H^+ -АТР-аза відграє роль насоса, який функціонує на плазматичній мембрані мітохондрій і призводить не тільки до синтезу та розпаду АТР, але й сприяє транспорту електронів [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

F_1F_0 -АТР-синтаза належать до родини ротаційних АТР-фаз [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. АТР-синтаза складається з 16 субодиниць, зібраних в два домени, а саме F_1 та F_0 , які являють собою з'єднанні ротаційні моторні білки, які обертаються в протилежних напрямках. Домен F_1 розміщується в мітохондріальному матриксі та складається з трьох α - й трьох β -субодиниць, які утворюють кільце. Варто відзначити, що саме домен F_1 являє собою роторний двигун, керований АТР та має каталітичні центри синтезу й гідролізу АТР. F_0 утворює протонний канал на внутрішній мітохондріальній мембрані та є протонним обертовим двигуном, який активується протонним градієнтом, який в свою чергу генерується дихальним ланцюгом [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. H^+ транспортуються від гідрофобного статора та ротора домена F_0 . Гідрофобна частина ротора являє собою кільцеподібний олігомер c -субодиниць, який під час синтезу АТР передає крутний момент гідрофільним γ і ϵ субодиницям ротора. Останні, у свою чергу, обертаються, викликаючи циклічні конформаційні зміни в β -субодиницях F_1 , що призводить до зв'язування субстрату та вивільнення продукту. Слід зауважити, що синтез АТР відбувається, коли ротор рухається за годинниковою стрілкою, а гідроліз – під час руху проти годинникової стрілки [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. За фізіологічних умов F_0 генерує більший крутний момент, ніж F_1 , і регулює напрямок обертання F_1 . Отже, коли pmf високе, F_1 каталізує реакцію синтезу АТР, а коли pmf зменшується – гідроліз АТР, а також змінює напрямок обертання F_0 , тим самим посилюючи перекачування протонів [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

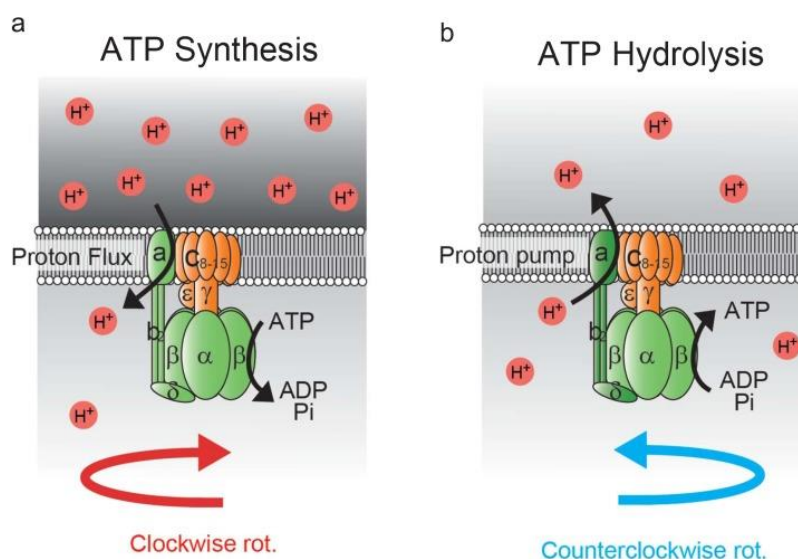


Рис.4.1 Механізм перетворення енергії F_0F_1 в умовах синтезу (а) або гідролізу (б) АТФ [Ошибка! Источник ссылки не найден.]

5. Вплив аліментарного дефіциту протеїну на стан організму

Нутрієнтний дисбаланс – це аномальний фізіологічний стан, спричинений незбалансованим або недостатнім споживанням макроелементів (вуглеводів, білків і жирів) та мікроелементів (вітамінів і мінералів), необхідних для нормального функціонування організму. Такий стан може бути результатом незбалансованої дієти, недостатнього споживання їжі, а також порушень метаболізму, які призводять до підвищеного використання або надмірного виведення поживних речовин з організму [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Важливим макронутрієнтом, необхідним для оптимального функціонування організму та підтримки гомеостазу, є білок. Рекомендована дієтична норма білка для здорової дорослої людини з мінімальною фізичною активністю наразі становить 0,8 г на кг маси тіла на день [Ошибка! Источник ссылки не найден., **Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Допустима верхня межа становить 3,5 г на кг маси тіла на день в деяких випадках. Проте постійне високе споживання білка (>2 г/кг маси тіла на день) може призвести до розладів травлення, порушення функціонування нирок та судин, тому його слід уникати [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. У здорових

дорослих людей кількість білка в організмі становить близько 15% від маси тіла. Білки є основними структурними складовими організму, окрім того, вони є важливими учасниками біохімічних реакцій організму в ролі ензимів, транспортерів, рецепторів, а також субстратів. Харчові білки забезпечують організм амінокислотами, які необхідні для синтезу власних білків, а також інших азотистих молекул [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Метаболічна ефективність білків значною мірою залежить від їх амінокислотного складу. Збалансована суміш амінокислот забезпечує вищу екзотермічну реакцію, ніж суміш амінокислот з меншою біологічною цінністю, пояснюючи, чому споживання рослинних білків призводить до меншого синтезу білка в організмі, ніж споживання тваринного білка [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Існує 20 протейногенних амінокислот, серед яких 9 вважаються незамінними, оскільки вони не синтезуються в організмі, тому вони повинні надходити з їжею. Отже, синтез білка насамперед залежить від збалансованого споживання саме незамінних амінокислот [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Саме білкова недостатність на сьогоднішній день є однією з найсерйозніших проблем харчування в усьому світі. Близько одного мільярда людей по всьому світі страждають від хронічної білкової недостатності. У Центральній Африці та Південній Азії до 30% дітей мають білкову недостатність. Окрім того, дефіцит білка також зустрічається і в економічно розвинених країнах [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Нестача білка в організмі призводить до широкого спектру порушень, а саме до відставання в рості, анемії, фізичної слабкості, набряків, серцево-судинної дисфункції, ослаблення імунітету, ендокринних порушень та інших. Варто відзначити, що чим вищий рівень нестачі білка в організмі, тим глибші ці порушення [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окрім того, нестача білка в раціоні посилює дефіцит інших поживних речовин, а також призводить до метаболічних порушень, таких як дисліпідемія та гіперглікемія. Це пояснюється тим, що білки необхідні для перетравлення

та поглинання харчових поживних речовин тонким кишечником, транспорту поживних речовини у крові та метаболізму інших поживних речовин [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Тому при нестачі білка порушуються такі процеси як глікогенез, гліколіз, ліпідний обмін тощо, проте насамперед порушується саме білковий обмін. Адаптаційні зміни обміну білків пов'язані зі зниженням або збільшенням виведення азоту у відповідь на дієти з низьким чи високим вмістом білка відповідно. Скелетна м'язова тканина є основним резервом білків в організмі, тому дефіцит білків може призвести до втрати м'язової маси через брак амінокислот-попередників для синтезу м'язового білка [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Окрім того, внаслідок білкового голодування спостерігається посилений протеоліз в скелетних м'язах, а утворені амінокислоти використовуються як попередники глюкози в процесі глюконеогенезу. Також при низькому надходженні білків порушується синтез деяких гормонів, а саме інсуліну, гормону росту та гормонів щитоподібної залози, що призводить до ендокринного дисбалансу [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Білкова недостатність може спричинити серйозні гематологічні зміни, а саме зниження гемопоезу, викликане аутофагічними механізмами або безпосередньо зниженою проліферацією гемопоетичних стовбурових клітин шляхом порушення клітинного циклу у G_0/G_1 фазах. Окрім того, опосередкований вплив нестачі білка проявляється у зміні мікрооточення гемопоетичних клітин, а також недостатньому синтезі цитокінів, що в свою чергу призводить до порушення проліферації й утворення клітин у червоному кістковому мозку. Описані зміни призводять до порушення еритропоезу і лейкопоезу, перешкоджають виробленню прозапальних цитокінів, що призводить й до погіршення імунної функції організму [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Білок є основним модулятором клубочкової фільтрації у нирках. Споживання раціону з високим вмістом білка призводить до збільшення швидкості клубочкової фільтрації, що в свою чергу призводить до «гломерулярної гіперфільтрації» та підвищення

внутрішньоклубочкового тиску. І, навпаки, нестача протеїну призводить до зниження внутрішньоклубочкового тиску та швидкості клубочкової фільтрації [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експеримент проводили за опрацьованою схемою: «Для проведення досліджень використовували білих безпородних щурів віком 2,5-3 місяці та масою 120-140 г. Умови утримання та маніпуляції, які проводили з дослідними тваринами в ході експерименту, відповідали положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та рекомендаціям «Біоетичної експертизи доклінічних та інших наукових досліджень, які виконуються на тваринах» (Київ, 2006).

Для проведення дослідження були сформовані чотири групи тварин. Перша група – це контрольні тварини (К), які отримували повноцінний напівсинтетичний раціон, що містив 14% білка (у вигляді казеїну), 10% жиру, 76% вуглеводів (10% сахарози), а також збалансовану мінеральну та вітамінну суміш, відповідно до рекомендацій Американського інституту нутрієнтології (Reeves et al., 1993). До другої групи увійшли тварини, яких утримували на низькопротеїновому раціоні (НПР), який містив 4,7% протеїну, 10% жирів, 85,3% вуглеводів та збалансовану суміш вітамінів й мінералів. Тваринами третьої групи (ТУ) моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном. До останньої групи увійшли тварини, яким після утримання на низькопротеїновому раціоні, моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном (НПР/ТУ).

Гостре токсичне ураження у дослідних тварин моделювали пероральним введенням ацетамінофену з розрахунку 1250 мг на кг маси щура у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю 1 раз на день впродовж останніх 2 діб експерименту (Gao et al., 2017).

Тривалість експерименту становила 28 діб. По його закінченню всіх тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом відповідно до рекомендацій та етичних норм з анестезії (Закон України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV «Про захист

тварин від жорстокого поводження»» [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Виділення мітохондріальної та цитозольної фракцій клітин нирок

Мітохондріальну й цитозольну фракції виділяли за допомогою методу диференційного центрифугування [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Для даного методу використовували середовище, яке містило 250 ммоль/л сахарози, 1 ммоль/л EDTA та 10 ммоль/л трис-HCl (pH 7,4). Спершу осаджували ядерну фракцію клітин центрифугуванням впродовж 10 хв при 1000 g. Отриманий супернатант відбирали та центрифугували протягом 10 хв при 12000 g. З отриманої надосадової рідини отримували мітохондріальну фракцію центрифугуванням протягом 15 хв при 12000 g. Одержаний осад (мітохондріальна фракція) промивали два рази середовищем без EDTA. Цитозольну фракцію осаджували додаванням до отриманого супернатанту йонів Ca^{2+} та Mg^{2+} (до 9 об'ємів надосаду – 1 об'єм 80 mM розчину CaCl_2 та 1 об'єм 160 mM MgCl_2 у 10 mM трис-HCl, pH 7,4) та подальшим центрифугуванням протягом 15 хв при 9000 g. Отриману надосадову рідину використовували як цитозольну фракцію.

Вміст протеїну в дослідних зразках визначали за методом Лоурі.

Визначення активності АМР-дезамінази

Активність АМР-дезамінази досліджували за методом, який ґрунтується на кількісному визначенні NH_3 , який виділяється в результаті реакції дезамінування АМР [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Вміст NH_3 визначали за допомогою кольорової реакції Бертло. Для проведення дослідів використовували інкубаційне середовище (0,05 М фосфатний буфер (pH 7,4), 0,05 MgCl_2 , 1 М KCl), 0,75% розчин АМР, а також реактив № 1 та реактив № 2. Для приготування першого реактиву змішували 5 г фенолу та 62,5 мг нітропрусид Na й доводили об'єм дистильованою водою до 500 мл. Для приготування другого реактиву змішували 50 г $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ та 10 мл гіпохлорит Na й доводили об'єм дистильованою водою до 500 мл. В

дослідні пробірки вносили по 1,5 мл інкубаційного середовища, 0,2 мл розчину АМФ та 0,1 мл цитоплазматичної фракції. В контрольні пробірки вносили 1,5 мл інкубаційного середовища, 0,2 мл дистильованої H_2O та 0,1 мл цитоплазматичної фракції. Далі проби інкубували 30 хв при $37^\circ C$, після чого добавляли реактив № 1 та реактив № 2 та центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. Оптичну густину надосаду вимірювали фотоелектроколориметрично при довжині хвилі 540 нм. Вміст NH_3 в пробах розраховували за калібрувальним графіком. АМР-дезаміназну активність визначали за формулою:

$$A = E [K] - E [Д] / 30 \times [C], \text{ де}$$

$E [K]$ – вміст NH_3 в контрольній пробі; $E [Д]$ – вміст NH_3 в дослідній пробі; 30 – час інкубування проб, хв; C – вміст протеїну в пробах, мг/мл.

АМР-дезаміназну активність виражали в мкмоль NH_3 /хв на мг протеїну.

Визначення активності 5'-нуклеотидази

Дослідження активності 5'-нуклеотидази проводили за методом, який базується на кількісному визначенні фосфатної кислоти, яка утворюється в результаті ферментативного гідролізу АМФ [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Вміст неорганічного фосфату визначали за допомогою кольорової реакції з молібденовим реактивом. Для дослідження використовували субстратно-буферний розчин № 1 (5 мг β -гліцерофосфату розчиняли в 10 мл 0,2 М трис- HCl , рН 7,5), субстратно-буферний розчин № 2 (10 мг АМФ розчиняли в 10 мл 0,2 М трис- HCl , рН 7,5) та 10% розчин ТХО. В усі пробірки вносили по 0,1 мл цитоплазматичної фракції. Далі в контрольні проби додавали по 0,6 мл субстратно-буферного розчину № 1, а в дослідні – субстратно-буферного розчину № 2. Проби поміщали в термостат на 3 год при $37^\circ C$. Після інкубації у пробірки добавляли по 0,7 мл розчину ТХО для зупинки ферментативної реакції та центрифугували при 2500 об/хв протягом 10 хв. В надосаді спектрофотометрично визначали вміст неорганічного фосфату

при довжині хвилі 625 нм. Розрахунок вмісту фосфату проводили за калібрувальним графіком. Активність 5'-нуклеотидази визначали за формулою:

$$A = [\Phi_d] - [\Phi_k] / 180 \times [C], \text{ де}$$

Φ_d – вміст фосфату в дослідній пробі, мг/мл; Φ_k – вміст фосфату в контрольній пробі, мг/мл; 180 – час інкубування проб, хв; C – вміст протеїну в пробах, мг/мл.

Ензиматичну активність 5'-нуклеотидази виражали в нмоль P_i /хв на мг протеїну.

Визначення активності H^+ -АТР-ази

Принцип визначення активності H^+ -АТР-ази базується на кількісному визначенні фосфату, який утворюється під час ферментативного гідролізу АТФ [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Кількість фосфату в пробах визначали за допомогою кольорової реакції з молібденовим реактивом. Для проведення дослідження використовували середовище інкубації, рН 7,4 (в розрахунку на 2 мл: 400 мкмоль трис-НCl, 120 мкмоль NaCl, 20 мкмоль KCl, 7,5 мкмоль $MgSO_4$, 7,5 мкмоль $CaCl_2$, 5 мкмоль АТФ, 0,05 мкмоль DNP) та 10 % розчин ТХО. В усі пробірки добавляли по 2 мл середовища інкубації та по 400 мкл мітохондріальної фракції. Проби поміщали в термостат на 15 хв при 37 °C. Після інкубації ферментативну реакцію зупиняли, додаючи в проби 1 мл розчину ТХО. Далі пробірки центрифугували 3 хв при 3000 g. В надосаді спектрофотометрично визначали вміст неорганічного фосфату при довжині хвилі 625 нм. Розрахунок проводили за калібрувальним графіком. Активність H^+ -АТР-ази розраховували за формулою:

$$A = ((C [P_i] / 15) / C) \times 10, \text{ де}$$

$C [P_i]$ – вміст фосфату в пробах, мг/мл; 15 – час інкубування проб, хв;
 C – вміст білка в пробах, мг/мл;

H^+ -АТР-азну активність виражали в нмоль P_i /хв*мг протеїну.

Визначення вмісту аденілових нуклеотидів

Вміст аденілових нуклеотидів (AMP, ADP, ATP) досліджували методом тонкошарової хроматографії з використанням пластинок Silufol UV-254 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Принцип методу ґрунтується на русі розчинника речовини в шарі сорбенту й просторовому розподілі різних компонентів залежно від їх властивостей та індивідуальних характеристик.

Перед проведенням дослідження з мітохондріальної фракції осаджували білки. Для цього до 0,5 мл мітохондріальної фракції добавляли 4% розчин HClO_4 та центрифугували протягом 10 хв при 3000 g. Далі відбирали надосадову рідину та додавали до неї 5 н КОН, витримували 1 год в холодильнику та центрифугували протягом 15 хв при 3000 g.

Для розділення аденілових нуклеотидів на попередньо підготовлену силуфолову пластинку на відстані 1,5-2 см від нижнього краю наносили по 40 мкл досліджуваної суміші нуклеотидів та стандартний розчин (0,01 М АМФ, 0,01 М АДФ, 0,01 М АТФ). Розчини наносили краплями і підсушували холодним повітрям. Пластинку поміщали в хроматографічну камеру, зануливши нижній край пластинки у розчинник: ізопропанол – вода – аміак (70 : 20 : 15). Після того як розчинник піднімався до верхнього краю пластинок, їх виймали та за допомогою ультрахемоскопа визначали розміщення аденілових нуклеотидів на хроматограмі. Ділянки, які поглинали УФ частину спектру, вирізали, стирали і елюювали протягом 3 год 0,1 н розчином HCl . Оптичну густину визначали в елюаті при довжині хвилі 260 нм та 290 нм. Розрахунок вмісту аденілових нуклеотидів проводили за формулою:

$$A = ((E_{260} - E_{290}) \times X) / C, \text{ де}$$

E_{260} – оптична густина проби при 260 нм; E_{290} – оптична густина проби при 290 нм; X – коефіцієнт молярного поглинання; C – вміст білка в пробах мг/мл.

Вміст аденілових нуклеотидів виражали в мкмоль/мг білка.

Для статистичної обробки та графічного представлення отриманих результатів було використано пакет аналізу даних «Microsoft Excel». Оцінювали середнє значення (M), а також стандартну похибку середнього (m). Статистичну значимість різниці середніх показників визначали, користуючись t -критерієм Стюдента. Отримані результати досліджень вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Функціонування нирок великою мірою залежить від енергетичного забезпечення клітин, оскільки цей орган відіграє гомеостатичну роль в організмі та здійснює життєво важливі функції, зокрема реабсорбцію, екскрецію кінцевих продуктів метаболізму та токсичних речовин, процеси біосинтезу, регуляцію електролітного та водно-сольового обміну, а також кров'яного тиску. Тому за умов нефротоксичного впливу ацетамінофену ефективність функціонування системи біотрансформації енергії клітин є вирішальною для забезпечення функціональної активності нирок. Варто зазначити, що молекулярні механізми, пов'язані з ацетамінофен-індукованою нефротоксичністю, на сьогодні не до кінця відомі.

Відомо, що основною макроергічною сполукою організму є АТР, тому на першому етапі експерименту нами було досліджено зміни вмісту компонентів аденілатного енергетичного пулу.

Результати дослідження показали, що у мітохондріях нирок щурів, яких утримували на низькопротеїновому раціоні (НПР), достовірних змін вмісту аденілових нуклеотидів відносно контролю не виявлено (рис. 3.1, 3.2, 3.3). При цьому нами встановлено, що за умов токсичного впливу ацетамінофену (ТУ) в мітохондріях нирок щурів спостерігається зниження вмісту АТР майже у 2 рази (рис. 3.1) на тлі зниження ADP та AMP порівняно з контролем (рис. 3.2, 3.3).

В літературних джерелах широко вивчалась гепатотоксичність, спричинена ацетамінофеном, проте позапечінкові прояви токсичності ацетамінофену на сьогодні недостатньо вивчені. Розвиток нефротоксичності, спричиненої ацетамінофеном, пов'язують з ізоферментами цитохрому Р-450, локалізованими в нирках, хоча були описані й інші механізми, зокрема роль ферментів простагландинсинтетази та N-деацетилази [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Численні дослідження показали важливість опосередкованого Cyp2E1 утворення токсичного

метаболіту – NAPQI, виснаження пулу глутатіону та утворення білкових аддуктів в розвитку гепатотоксичності [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

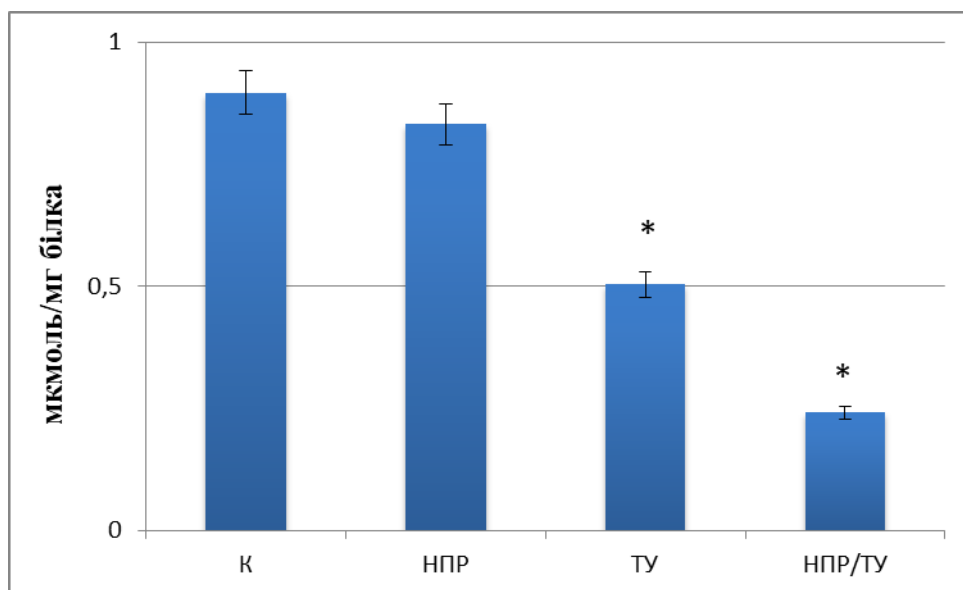


Рис. 3.1. Вміст АТР у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності

Примітка (тут та надалі): К – контрольні тварини, які споживали повноцінну напівсинтетичну дієту; НПР – тварини, які споживали низькопротеїнову дієту; ТУ – тварини, яким вводили токсичні дози ацетамінофену; НПР/ТУ – тварини, яким на тлі низькопротеїнової дієти вводили токсичні дози ацетамінофену;

** – статистично достовірна різниця порівняно з контрольним значенням, $P \leq 0,05$.*

Також встановлено, що утворення NAPQI-аддуктів в мітохондріях посилює окислювальний стрес, який призводить до фосфорилування JNK [Ошибка! Источник ссылки не найден.], відкриття пор мітохондріальної проникності (MPTP), розриву зовнішньої мембрани мітохондрій, вивільнення міжмембранних ендонуклеаз та деградації ядерної ДНК. Сучасні дослідження підтвердили, що АРАР все ж таки може метаболізуватися за допомогою Сур2Е1 й у нирках, утворюючи токсичний метаболіт – NAPQI,

який виснажує пул глутатіону та утворює NAPQI-аддукти [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

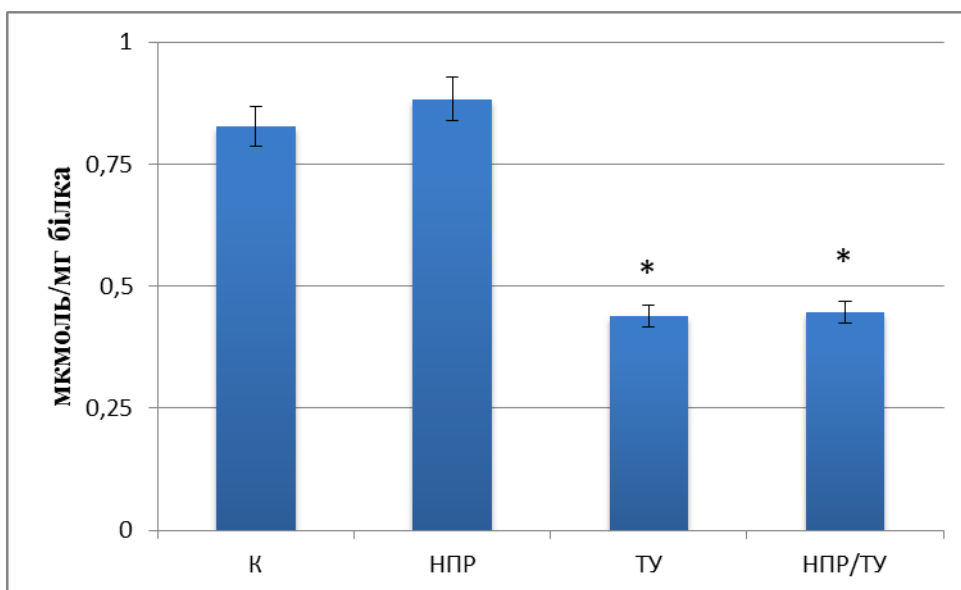


Рис. 3.2. Вміст ADP у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності

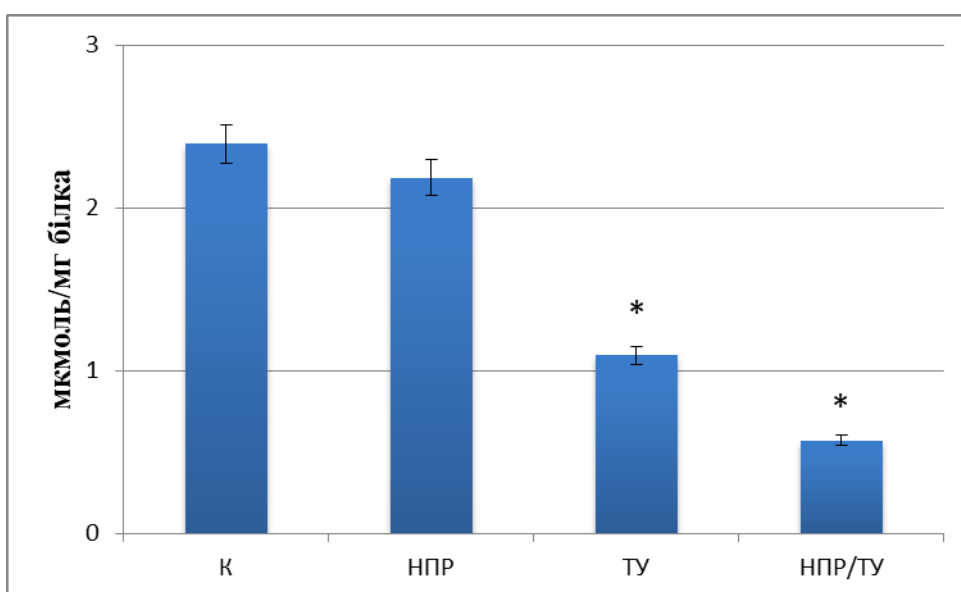


Рис. 3.3. Вміст AMP у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності

Як підтвердження цьому факту гістологічний аналіз нирок при інтоксикації ацетамінофеном демонструє гострий некроз саме в проксимальних ниркових канальцях, де, імовірно, й локалізується Сур2Е1 [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Зниження пулу АТР, імовірно, свідчить про посилення процесу гідролізу АТР або недостатню швидкість ресинтезу аденілових нуклеотидів, що може бути результатом зниження ензиматичної активності ключових ферментів електронтранспортного ланцюга мітохондрій внаслідок розвитку окисного стресу. У попередніх дослідженнях, проведених на кафедрі, було показано, що за умов інтоксикації ацетамінофеном відбувається порушення ферментативної активності комплексів дихального ланцюга, зокрема знижується активність NADH-убіхінонредуктази, сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Окрім того, за умов токсичного впливу ацетамінофену спостерігається вихід через мітохондріальну пору перехідної проникності цитохрому *c*, який є необхідним компонентом транспорту електронів, тому це додатково сприяє порушенню генерації АТР та мітохондріальній дисфункції [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Варто відзначити, що в джерелах літератури підтверджується зниження вмісту мітохондріальних цитохромів за досліджувальних умов [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Описані вище зміни, імовірно, призводять до пригнічення процесу окислювального фосфорилування та дисфункції мітохондрій, наслідком чого стає зниження пулу макроергічних сполук.

Максимально виражені зміни вмісту аденілових нуклеотидів спостерігали у групи тварин НПРТ/ТУ. У мітохондріях нирок білок-дефіцитних щурів з ацетамінофен-індукованою нефротоксичністю вміст АТР сягає критично низьких значень на тлі збереження ADP на рівні показників групи ТУ та зниження вмісту AMP більш ніж 4 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 3.1., 3.2, 3.3). Встановлені зміни, імовірно, є наслідком порушення синтезу пуринових нуклеотидів *de novo*, оскільки на сьогодні відомо, що основними субстратами для синтезу пуринових нуклеотидів виступають амінокислоти [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Зафіксоване зменшення пулу аденилових нуклеотидів в клітинах нирок щурів за умов токсичного впливу ацетамінофеном на тлі споживання раціону з низьким вмістом білка свідчать про розвиток енергетичного дефіциту, що негативно вплине на функціонування нирок. Виявлені зміни вмісту компонентів аденилатного енергетичного пулу в мітохондріях нирок щурів важливі для оцінки енергетичного балансу за умов токсичного ураження ацетамінофеном та інформативні для з'ясування направленості біохімічних шляхів за досліджуваних умов.

Можливо, встановлене нами зниження пулу АТФ на тлі зниження АДФ та АМР за досліджуваних умов пов'язане зі зміною активності ключового ензиму системи біотрансформації енергії – H^+ -АТФ-ази.

H^+ -АТФ-аза – це складний інтегральний білок внутрішньої мембрани мітохондрій, який являє собою V комплекс електронтранспортного ланцюга, під час роботи якого утворюється АТФ шляхом окисного фосфорилування АДФ за допомогою електрохімічної енергії, що генерується протонним градієнтом через внутрішню мембрану мітохондрій. Варто відзначити, що даний ензим каталізує як пряму реакцію синтезу, так і зворотню реакцію гідролізу АТФ до АДФ та неорганічного фосфату. Переважання гідролазної активності спостерігається під час роз'єднання процесу транспорту електронів та окислювального фосфорилування за умов порушення цілісності мембрани мітохондрій [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Результати проведених досліджень показали, що за умов споживання низькопротеїнового раціону в мітохондріальній фракції нирок щурів не спостерігається достовірної зміни гідролазної активності H^+ -АТФ-ази (рис. 3.4). Водночас за умов токсичного впливу ацетамінофену активність H^+ -АТФ-ази в мітохондріальній фракції нирок щурів зростає майже в 1,5 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 3.4). Варто відзначити, що у групи тварин НПР/ТУ зафіксовано найвище значення ензиматичної активності H^+ -АТФ-ази (рис. 3.4).

В літературі показано, що транслокація фосфорильованих JNK до мітохондрій посилює вільнорадикальні процеси та індукує відкриття мітохондріальної пори перехідної проникності (МРТР) [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Індукція МРТР, імовірно, призводить до посилення гідролазної активності H^+ -АТР-ази, оскільки за даних умов відбувається деполяризація мембрани мітохондрій внаслідок порушення її цілісності.

Отже, зафіксоване нами зниження рівня АТР (рис 3.1) у мітохондріях нирок щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну узгоджується з отриманими результатами зміни гідролазної активності H^+ -АТР-ази.

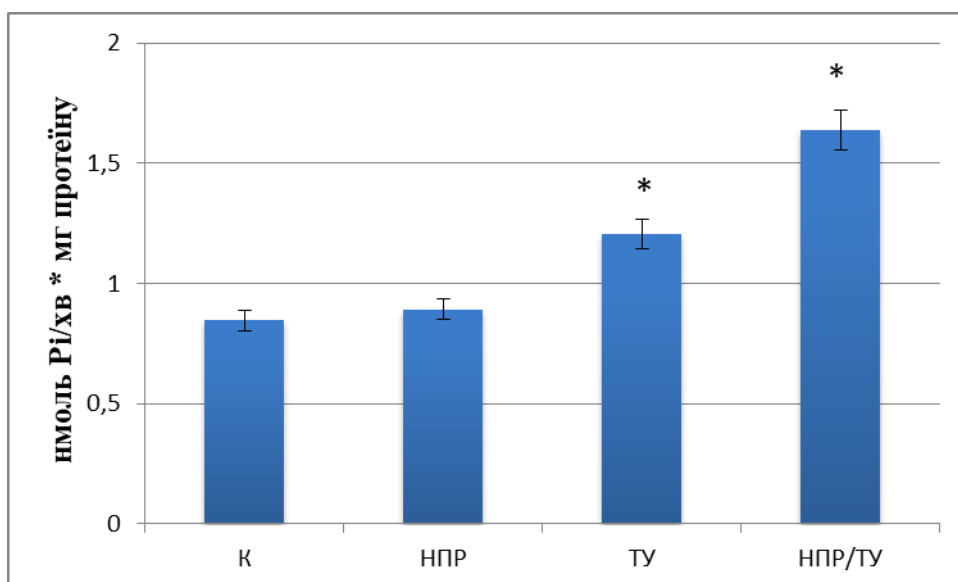


Рис. 3.4. Активність H^+ -АТР-ази у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності

Відомо, що зміна рівня АМР є найкращим маркером стану енергетичної системи клітини. Окрім того, механізм підтримання аденілатного енергетичного заряду клітин в більшості тканин взаємопов'язані саме з метаболізмом АМР [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Отримані зміни вмісту АМР у мітохондріях нирок щурів за досліджуваних умов, імовірно, пов'язані зі зміною активності ензимів катаболізму аденілових нуклеотидів. Ключовими ензимами, які задіяні в

катаболізмі аденілових нуклеотидів, є 5'-нуклеотидаза, яка забезпечує гідроліз нуклеотидів, зокрема АМР та ІМР, до відповідних нуклеозидів та неорганічного фосфату, а також АМР-дезаміназа, лімітуючий ензим катаболізму АМР, який каталізує реакцію перетворення АМР до ІМР та аміаку [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Отже, субстратом для вищезгаданих ензимів є саме АМР.

Проведені дослідження активності даних ензимів показали, що у цитозольній фракції нирок щурів, яких утримували на низькопротеїновій дієті, спостерігається зниження у 1,5 рази активності 5'-нуклеотидази (рис. 3.5) на тлі збереження АМР-дезаміназної активності на рівні показників контрольних тварин (рис. 3.6).

Проте за умов інтоксикації ацетамінофеном активність АМР-дезамінази у цитозолі нирок щурів зростає у понад 2 рази (рис. 3.6) на тлі зниження 5'-нуклеотидазної активності майже у 3 рази (рис. 3.5). Встановлені результати вказують на переключення катаболізму АМР з 5'-нуклеотидазного шляху на АМР-дезаміназний шлях. Імовірно, встановлені нами результати пов'язані з низкою причин. По-перше, у літературних джерелах показано, що за умов енергодефіцитних станів зазвичай спостерігається посилене дезамінування АМР до ІМР. Можливо, за таких умов, продукт АМР-дезаміназної реакції, зокрема ІМР, є більш необхідним, ніж продукт 5'-нуклеотидазної реакції. Оскільки відомо, що ІМФ є центральним проміжним метаболітом у шляху метаболізму пуринів і надалі може включатись в пул аденілових нуклеотидів, а саме бути попередником для синтезу АМР, інозину та GMP, що за умов токсичного впливу ацетамінофену може бути проявом компенсаторної реакції. До того ж, інозин, який утворюється з ІМР є регулятором експресії низки протеїнів, які задіяні в антиоксидантному захисті клітин та передачі внутрішньоклітинних сигналів [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

По-друге, G. Косіс зі співавторами у своїй роботі [Ошибка! Источник ссылки не найден.] підкреслили, що підвищення активності АМР-дезамінази індукує

активність ензимів гліколізу, зокрема фосфоглюкокінази та піруваткінази, що за умов ацетамінофен-індукованої нефротоксичності може бути проявом адаптивної реакції організму.

Водночас зниження 5'-нуклеотидазної активності за умов токсичного впливу ацетамінофену, імовірно, є наслідком посилення вільнорадикальних процесів у клітинах, оскільки в літературних джерелах вказується, що за умов розвитку окисного стресу відбувається незворотна інактивація 5'-нуклеотидази [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

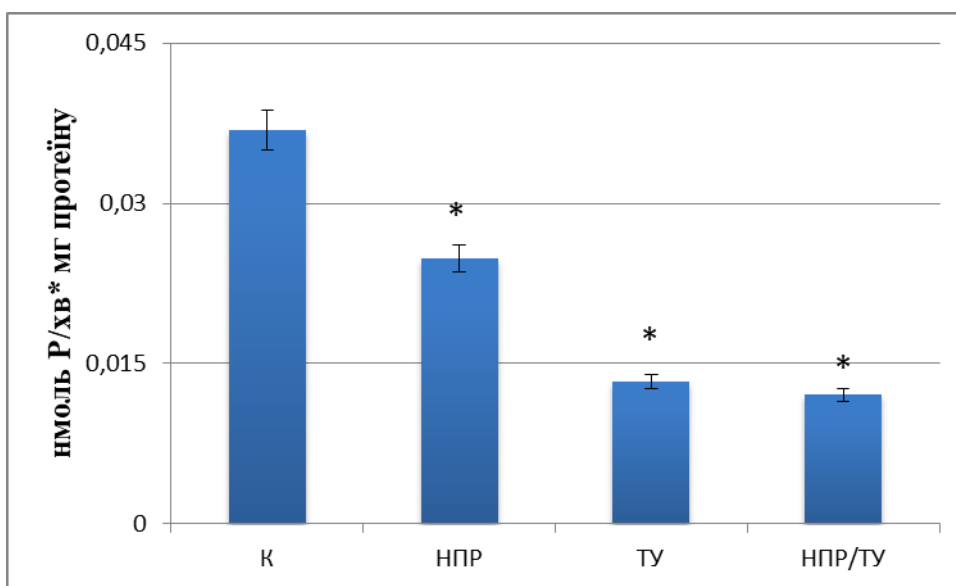


Рис. 3.5. Активність 5'-нуклеотидази у цитозольній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності

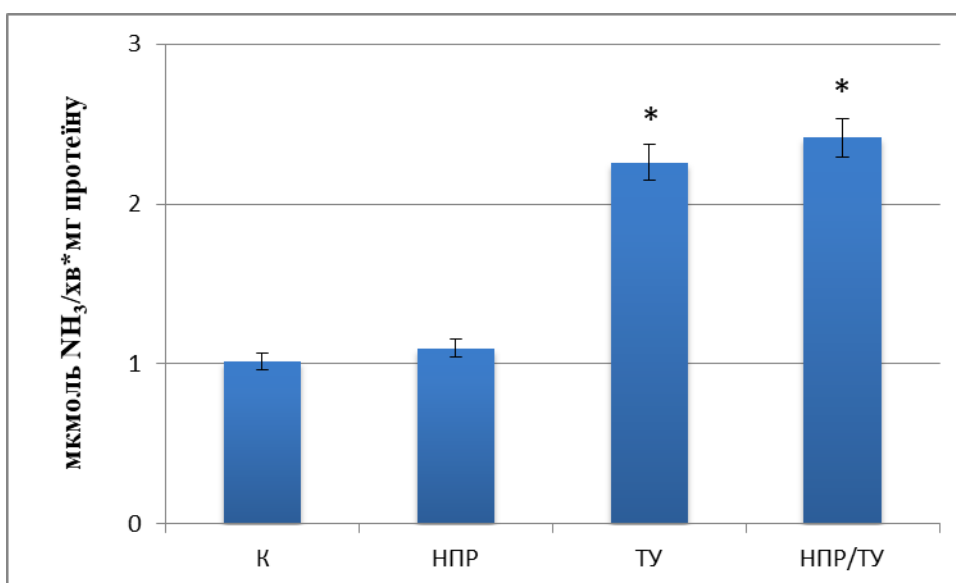


Рис. 3.6. Активність АМР-дезамінази у цитозольній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності

Слід зазначити, що у тварин групи НПР/ТУ показники АМР-дезаміназної (рис. 3.6) та 5'-нуклеотидазної активності (рис. 3.5) достовірно не відрізняються від показників групи ТУ, що, ймовірно, вказує на визначальний вплив ацетамінофену на стан катаболізму аденілових нуклеотидів.

Спостережувані зміни активності ензимів катаболізму АМР дозволяють зробити висновок, що активація ензиматичної активності АМР-дезамінази на тлі зниження 5'-нуклеотидазної активності може розглядатися як одна із ланок компенсаторного механізму, спрямованого на підтримання енергетичного балансу клітин нирок за умов токсичного ураження ацетамінофеном та аліментарного дефіциту протеїну.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у клітинах нирок щурів, які споживали низькопротеїновий раціон (НПР), не змінюється вміст аденілових нуклеотидів та відсутні достовірні зміни активності H^+ -АТР-ази та АМР-дезамінази, проте спостерігається зниження 5'-нуклеотидазної активності порівняно з показниками контрольних тварин.

2. У клітинах нирок тварин, яким вводили токсичні дози ацетамінофену, спостерігається достовірне зниження вмісту АТР на тлі виснаження пулу ADP та АМР. При цьому зростає АМР-дезаміназна та H^+ -АТР-азна активності у 2 та 1,5 рази відповідно на тлі зниження активності 5'-нуклеотидази майже у 3 рази порівняно з контролем.

3. Максимально виражені зміни вмісту АТР, АМР та H^+ -АТР-азної активності зафіксовано у групи тварин НПР/ТУ, проте достовірних змін вмісту ADP та активності 5'-нуклеотидази й АМР-дезамінази порівняно з групою ТУ не виявлено.

Отже, наслідком встановлених нами змін обміну аденілових нуклеотидів може бути формування енергетичного дисбалансу, що в свою чергу може призводити до порушення функціональної активності нирок.