

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**  
**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів**  
**Кафедра біохімії та біотехнології**

**ПОКАЗНИКИ ОБМІНУ АМІАКУ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО  
УРАЖЕННЯ НА ТЛІ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ ПРОТЕЇНУ**

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

*Виконала:*

студентка 6 курсу, 600-М групи

**Шевченко Софія Юріївна**

*Керівник:*

Кандидат біологічних наук, доцент

**Волощук О. М.**

*До захисту допущено*  
*на засіданні кафедри*  
*протокол № \_\_\_\_\_ від \_\_\_\_\_ 2024 р.*  
*Зав. кафедри \_\_\_\_\_ проф. Копильчук Г.П.*

Чернівці – 2024

## АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню показників метаболізму аміаку у щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном та аліментарного дефіциту протеїну.

Встановлено, що достовірне підвищення вмісту залишкового азоту та глютаміну у сироватці крові спостерігається лише у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном, які перебували на повноцінному харчуванні. Водночас у тварин групи НПР/ТУ спостерігається перерозподіл між окремими компонентами залишкового азоту, зокрема підвищення вмісту глютаміну, за умов збереження загального вмісту залишкового азоту. При цьому зростання нітрогену аміаку у сироватці крові спостерігається у групах щурів, яким моделювали токсичне ураження, незалежно від забезпеченості раціону протеїном, що свідчить про формування у них стану гіперамоніємії.

Встановлено, що за умов токсичного ураження ацетамінофеном підвищення вмісту аміаку у сироватці крові не пов'язане з його посиленням утворенням, оскільки у печінці не спостерігається підвищення активності основних ензимів утворення аміаку – глютамінази та глютамаатдегідрогенази. Натомість, результати проведених досліджень показали, що у групах ТУ та НПР/ТУ спостерігається зниження активності ключового ензиму знешкодження аміаку у печінці – карбамоїлфосфатсинтетази, що може стати причиною формування стану гіперамоніємії за досліджуваних умов.

Отже, визначення активностей ензимів метаболізму аміаку у щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну показало, що накопичення аміаку не пов'язане з його посиленням утворенням, а зумовлене порушенням знешкодження даного метаболіту за умов експерименту.

**Ключові слова:** ацетамінофен, токсичне ураження, аміак, гіперамоніємія.

## ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the study of ammonia metabolism indicators in rats under the conditions of toxic damage by acetaminophen and dietary protein deficiency.

It was established that a significant increase in the content of residual nitrogen and glutamine in the blood serum is observed only in animals with toxic damage by acetaminophen, which were on full nutrition. At the same time, in the animals of the NPR/TU group, there is a redistribution between individual components of residual nitrogen, in particular, an increase in the content of glutamine, under conditions of preservation of the total content of residual nitrogen. At the same time, the growth of ammonia nitrogen in blood serum is observed in groups of rats that were simulated toxic damage, regardless of the provision of protein in the diet, which indicates the formation of hyperammonemia in them. It was established that under the conditions of toxic damage by acetaminophen, the increase in the ammonia content in the blood serum is not related to its increased formation, since in the liver there is no increase in the activity of the main enzymes of ammonia formation - glutaminase and glutamate dehydrogenase. On the other hand, the results of the conducted research showed that in the TU and NPR/TU groups there is a decrease in the activity of the key enzyme of ammonia neutralization in the liver - carbamoyl phosphate synthetase, which can cause the formation of a state of hyperammonemia under the studied conditions. Therefore, the determination of the activities of ammonia metabolism enzymes in rats under the conditions of toxic damage by acetaminophen against the background of dietary protein deficiency showed that the accumulation of ammonia is not related to its enhanced formation, but is caused by a violation of the neutralization of this metabolite under the experimental conditions.

**Key words:** acetaminophen, toxic damage, ammonia, hyperammonemia.

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

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	7
1.1. Механізми токсичної дії ацетамінофену.....	7
1.2. Причини та наслідки протеїнової недостатності.....	12
1.3. Особливості метаболізму аміаку в тканинах.....	16
1.3.1. Основні шляхи утворення аміаку.....	16
1.3.2. Механізми токсичності аміаку .....	20
1.3.3. Ключові механізми знешкодження аміаку в організмі.....	23
<b>РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	28
2.1. Об'єкти та методи досліджень.....	28
<b>РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ</b> .....	34
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	48
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	49
<b>ДОДАТКИ</b> .....	58

## ВСТУП

Ацетамінофен (АРАР) – широко розповсюджений жарознижуючий і знеболюючий безрецептурний засіб, відомий побічний ефект застосування якого – це порушення функцій печінки та нирок. Однією із можливих причин такого впливу вважається метаболізм ацетамінофену, що реалізується в обох органах з утворенням високоактивного *N*-ацетил-*p*-бензохіноніміну (NAPQI) [1]. Відомо, що токсичність ацетамінофену посилюється за умов тривалого голодування, зокрема, аліментарного дефіциту протеїну. Насамперед, це пов'язано із нестачею сульфуровмісних амінокислот, необхідних для синтезу глутатіону – ключового агента у кон'югації та антиоксидантному захисті від NAPQI [2].

Унаслідок пошкодження тканин печінки відбувається підвищення концентрації аміаку у крові, тобто виникає стан гіперамоніємії. Першопричиною вважається порушення роботи ензимів метаболізму аміаку, зокрема, циклу сечовини. Оскільки аміак є сильним нейротоксином, то підвищення його концентрації може призвести до неврологічних порушень [3].

Основними транспортним формами азоту в організмі виступають глутамін та аланін. До ензимів, які забезпечують вивільнення аміаку належить, передусім, глутаміназа [4]. Також важливу роль у цьому процесі відіграють мітохондріальна глутаматдегідрогеназа, яка каталізує перетворення глутамату до  $\alpha$ -кетоглутарату з виділенням аміаку, та моноамінооксидаза, що здійснює дезамінування біогенних амінів [5]. Натомість ключова роль у детоксикації аміаку в печінці належить карбамоїлфосфатсинтетазі циклу сечовини та глутамінсинтетазі, які шляхом синтезу відповідних транспортних форм забезпечують ефективно зв'язування та видалення аміаку [6].

**Мета роботи** – визначення активностей ензимів метаболізму аміаку у щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

Для досягнення мети перед нами були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити вміст залишкового азоту, аміаку та глутаміну у сироватці крові щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

2. Дослідити активності глутаматдегідрогенази, моноамінооксидази та глутамінази як основних ензимів утворення аміаку у мітохондріальній фракції печінки та нирок щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

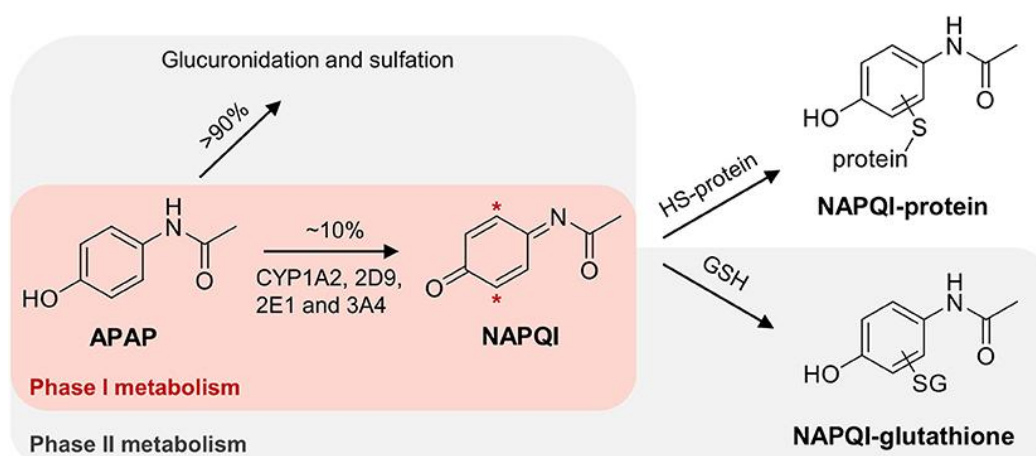
3. Визначити активність карбамоїлфосфатсинтетази як ключового ензиму знешкодження аміаку у печінці за умов токсичного ураження ацетамінофеном та різних режимів білового харчування.

## РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Механізми токсичної дії ацетамінофену

На сьогодні відомо, що біохімічні перетворення ацетамінофену в організмі можуть стати причиною ініціації цілого каскаду реакцій, які у підсумку призводять до токсичного ураження [7]. При цьому зміни у перетворенні АРАР на мітохондріальному та мікросомальному рівнях є факторами ризику, які призводять до ураження печінки навіть у разі приймання безпечних доз цього препарату [8]. Проте, за звичайних умов, саме передозування вважається визначальним чинником, що провокує токсичний ефект [9].

Вважається, що ключова роль у перетворенні АРАР належить мікросомам печінки, де відбуваються основні процеси детоксикації цієї речовини [8]. При цьому за умов надходження в організм терапевтичних доз парацетамолу, 85% знешкоджується шляхом сульфатації або глюкуронізації з утворенням водорозчинних кон'югатів, які виводяться нирками. Натомість приблизно 15% спрямовується на окислення за дії цитохрому Р450 2Е1 до N-ацетил-*p*-бензохіноніміну. Цей метаболіт характеризується високою токсичністю та за звичайних умов знешкоджується шляхом кон'югації з глутатіоном до тіолату та цистеїну (рис. 1.1.1) [9, 10].



**Рис. 1.1.1.** Схема метаболізму АРАР з кон'югацією GSH та ковалентним зв'язуванням цистеїну у складі білка [11]

Передозування, як основний фактор дестабілізації метаболізму АРАР, призводить до перенасичення ключових шляхів детоксикації препарату, посилення перетворення за участі цитохрому Р450 2Е1 та порушення балансу між продукцією, знешкодженням і транспортом токсичних метаболітів [8]. За таких умов, ймовірно, буде спостерігатися виснаження печінкового пулу глутатіону на 80-90% і накопичення у значній кількості білкових кон'югатів.

У 70-х рр. ХХ ст. проведено дослідження, спрямовані на розробку ефективного лікарського препарату, що може використовуватися при передозуванні АРАР. Найбільш дієвим тоді визнано сірковмісну сполуку *N*-ацетилцистеїн (НАС). Згодом, у 80-х рр. методом радіоактивного мічення із використанням [<sup>35</sup>S]-НАС було з'ясовано механізм, за яким даний препарат здійснює гепатопротекторний ефект, а саме, шляхом посилення синтезу глутатіону [12].

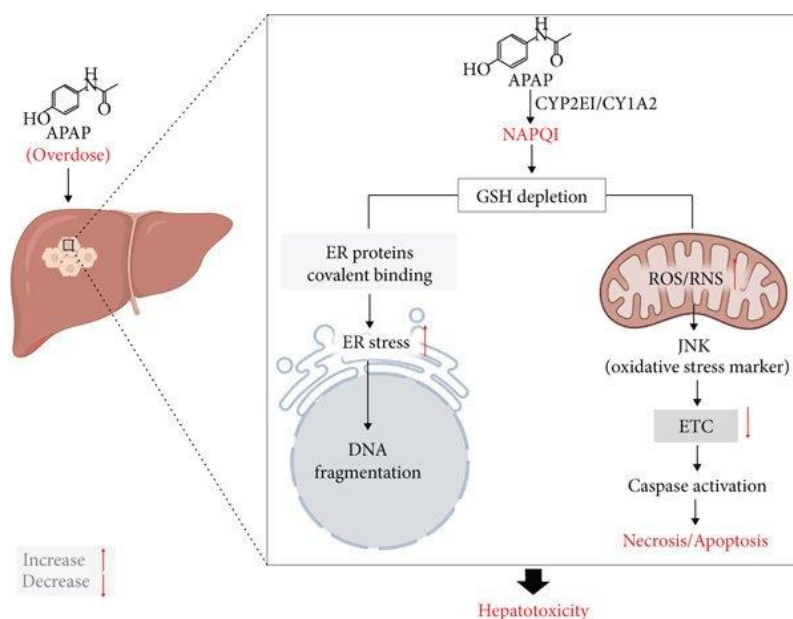
На сьогодні встановлено, що ензимами, відповідальним за детоксикацію НАРQI є глутатіон-S-трансферази, основними з яких є GST-Pi. Окрім того, відомо про існування ще одного антиоксиданту, здатного знешкоджувати токсичний НАРQI, а саме, аскорбінову кислоту, яка відновлює його назад до АРАР. Проте, як було показано раніше, в умовах *in vivo* ключовим антиоксидантом виступає саме GSH. Доказом цього є експеримент із тваринами, яким вводили високі дози аскорбінової кислоти (400 мг/кг), що призводило до підвищення її рівня у печінці, але не впливало на токсичність ацетамінофену [13]. Згодом, це підтверджено відкриттям, що кон'югація з GSH відбувається значно швидше, ніж відновлення аскорбіновою кислотою [12].

Можливість токсичного ураження печінки АРАР посилюється такими факторами як голодування, тривале зловживання алкоголем та приймання інших лікарських препаратів. Ймовірною причиною ушкодження тканин органа вважається нестача глутатіону та роль етанолу як конкурентного субстрату з АРАР для цитохрому Р450 [2].



На сьогодні з'ясовано, що важливе значення у метаболізмі ацетамінофену мають вік та генетичні фактори. Так, особи молодого віку відрізняються кращою здатністю переносити гепатотоксичність. Це пов'язують передусім з вищою швидкістю детоксикації та регенеративних процесів у печінці. Окрім того, генетичний поліморфізм та активність цитохромів також впливають на швидкість метаболізму препарату і можуть змінювати його як у позитивну, так і негативну сторони.

Ключовим фактором, що ініціює токсичне ураження, є N-ацетил-*p*-бензохінонімін, який характеризується здатністю зв'язуватися із білками, особливо тими, що заходяться у складі мітохондрій. Така взаємодія можлива через тіольні групи білків та, як наслідок, запускає генерацію активних форм кисню [8]. Загалом, припускається, що саме утворення аддуктів APAP із білками мітохондрій є причиною дисфункції цих органел за умов токсичного ураження [14].



**Рис. 1.1.2.** Механізми впливу окисного стресу при ураженні печінки ацетамінофеном [15]

Накопичення білкових кон'югатів у мітохондріях та одночасне виснаження пулу глутатіону призводить до порушення антиоксидантного захисту цих органел та можливості ефективно генерувати АТФ [8]. Окрім того, ушкодження мітохондріальної ДНК за подібним механізмом призводить

до активації сигнального шляху, який ініціює відкриття пор у мембрані цих органел. Надмірне утворення NAPQI за умов передозування призводить до пошкодження різних клітинних макромолекул – білків, ліпідів, нуклеїнових кислот [10]. Накопичення модифікованих молекул у клітинах стає причиною розвитку оксидативного та нітрозативного стресів. Механізм такого ушкодження ґрунтується на взаємодії NAPQI з компонентами дихального ланцюга мітохондрій, що призводить до їх дисфункції та відтоку електронів на кисень з подальшою продукцією супероксиду. Ця молекула далі (особливо за умов порушення антиоксидантних функцій клітин) здатна утворювати пероксинітрит через взаємодію з оксидом нітрогену. Дана сполука, своєю чергою, також володіє модифікаційною здатністю та призводить до появи білкових аддуктів ніротирозину [2]. До зазначених типів ушкодження найбільш чутливі мітохондрії, що призводить до порушення їх функціонування та припинення синтезу АТФ [8].

Оксидативний стрес мітохондрій, що виникає за умов передозування АРАР, ініціює активацію сигнальних шляхів у цитозолі, що посилюють та подовжують процес ушкодження (рис. 1.1.2). Індуктором таких процесів вважається пероксинітрит, який здатен проникати крізь мембрани шляхом пасивної дифузії або за допомогою аніонних каналів (як то VDAC). Цитозольна локалізація пероксинітриту активує каскад реакцій, що на завершальному етапі призводять до активації N-кінцевої кінази c-Jun (JNK). Ймовірно, що ключовим механізмом у цій реакції виступає окислення білка тіоредоксину. Цитозольний тіоредоксин 1, як правило, знаходиться у комплексі з кіназою 1 (ASK1), яка регулює сигнал апоптозу. Окислення даного білка призводить до дисоціації комплексу та наступної активації ASK1 шляхом фосфорилування. На підтвердження цьому було встановлено участь пероксинітриту у розпаді ASK1-тіоредоксину при постішемичному інфаркті міокарда, що може спостерігатися при передозуванні АРАР [16].

З огляду на функціональну важливість, компоненти дихального ланцюга мітохондрій є критичними мішенями при токсичному ураженні.

Раніше дослідження за участі гепатоцитів *in vitro* показали підвищену чутливість до модифікації комплексу II порівняно з комплексом I за прямого впливу NAPQI.

На сьогодні досить відомим білком, який виступає мішенню для модифікації, є  $\alpha$ -субодиниця АТФ-синтетази. Оскільки даний ензим є центральною ланкою у генерації АТФ, то, ймовірно, що утворення аддуктів з АРАР негативно впливає на його синтетичну активність. Серед білків мішеней також виявлено ряд антиоксидантів, до яких належать глутатіонпероксидаза, пероксиредоксин 6, редокс-чутливий шаперон PARK7 та іонний канал VDAC2 зовнішньої мембрани мітохондрій. Отже, можна припустити, що одночасне порушення активності АТФ-синтетази та факторів антиоксидантного захисту призведе до підвищення мембранного потенціалу мітохондрій, зворотного транспорту електронів та посиленої продукції супероксиду [16].

Як було описано раніше, АРАР може виступати ініціатором відкриття мітохондріальних пор проникності, при цьому слід підкреслити, що при високій концентрації (а саме 300 мг/кг) таке явище є незворотним процесом. Подальшим розвитком подій є розрив мембрани та вивільнення мітохондріальних молекул у цитоплазму серед яких такі індуктори апоптозу як АІФ, цитохром С та ендонуклеаза G, що фрагментують ядерну ДНК. Логічним наслідком буде розвиток захисного механізму шляхом аутофагії, яка спрямована на деградацію аномальних білків та ушкоджених органел [2].

Відомою формою адаптації до ацетамінофен-індукованого ураження у клітинах печінки є мітофагія – різновид аутофагії, що дозволяє видаляти пошкоджені мітохондрії. Важливість даної захисної реакції обумовлена можливістю своєчасно видаляти нефункціональні органели, обмежувати поширення некрозу та посилювати регенераційні процеси у тканині.

Ушкодження мітохондрій та некротичне ураження тканин стають передумовою виходу у цитозоль, а згодом і у кровообіг ряду макромолекул, які можна розглядати як біомаркери токсичного ураження АРАР. Сюди

належать мтДНК, ферменти глутаматдегідрогеназа (GLDH) та карбамоїлфосфатсинтетаза-1. Окрім того, відомо, що вказані молекули можуть виступати у ролі антигенів здатних взаємодіяти з рецепторами лейкоцитів та ініціювати їх переміщення до некротичного осередку. При цьому, було експериментально підтверджено факт участі, активованих таким чином імунних клітин, у регенеративних процесах ушкодженої ділянки [16].

## 1.2. Причини та наслідки протеїнової недостатності

Амінокислоти, надійшовши в організм, надалі здатні перетворюватися двома шляхами: використовуватися для синтезу білків та зазнавати катаболізму, втрачаючи  $\alpha$ -аміногрупу, яка використовується у синтезі сечовини. У зв'язку із цим, утворення сечовини може слугувати критерієм оцінки забезпеченості протеїном [17].

Нині існують дослідження, які дають підстави розглядати дефіцит сірковмісних амінокислот у раціоні як лімітуючий фактор виникнення деяких захворювань. Відомо, що метіонін та цистеїн важливі для синтезу будь-яких білків організму, а передусім тих, що входять до складу волосся та шкіри. Нестача цих амінокислот стає причиною характерного порушення цілісності слизових оболонок та появи набряків, що спостерігається при квашіоркорі. Це явище пов'язують порушенням сульфування глікозаміногліканів, що входять до складу глікокаліксу.

Дефіцит білка здатен посилювати нестачу інших поживних речовин, включаючи вітамін А, залізо, цинк та фолієву кислоту. Пояснення цьому знаходять в участі протеїнів у наступних процесах:

- травлення та всмоктування у тонкому кишківнику;
- транспорт (жирних кислот, холестерол, вітаміну А, заліза);
- окислення поживних речовин до кінцевих продуктів [18].

Так, метіонін залучений у перетворенні холіну, бетаїну, фолієвої кислоти, вітаміну B<sub>12</sub> та є важливим субстратом для синтезу карнітину. Активною формою амінокислоти є S-аденозилметіонін, який виступає

основним донором метильної групи. Окрім того, нестача метіоніну може порушити синтез білків, окислення жирних кислот та функції мітохондрій.

Значення цистеїну обумовлене передусім положенням атома сульфуру у молекулі амінокислоти. Це забезпечує з одного боку можливість віддачі даного атома у ході реакції, а з іншого – утворення зв'язків для стабілізації вторинної структури білка. Важливою молекулою для утворення якої необхідний цистеїн, є глутатіон. Проте, відомо, що потреба участі цистеїну в інших процесах може спонукати його звільнення зі складу глутатіону, до прикладу, для синтезу білків [19].

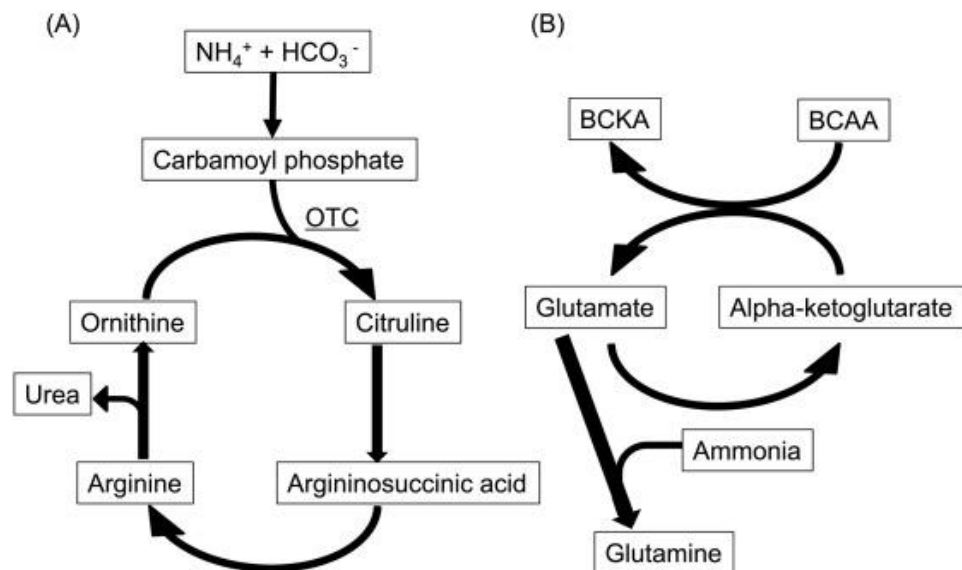
Крім того, на сьогодні доведено важливість нормального забезпечення сірковмісними амінокислотами для збереження кислотно-відновного гомеостазу та регуляції метаболізму аміаку в організмі. Споживання значної кількості білка, зокрема сірковмісних амінокислот, стає причиною посилення ендогенної продукції кислоти та виділення аміаку, і навпаки [17].

Порушення азотистого обміну, зокрема метаболізму протеїнів, пов'язують із деяким захворюваннями печінки. Відповідно до літератури, обмеження споживання білка, мальабсорбція та одночасне порушення функції печінки посилюють білкову недостатність в організмі. Насамперед дефіцит амінокислот із розгалуженим бічним ланцюгом стає причиною порушення синтезу білків. Перш за все це впливає на здатність печінки синтезувати альбуміни – основні білки крові (60%). До того ж було з'ясовано, що за даних умов не спостерігається дефіциту ароматичних амінокислот, у зв'язку із чим було виведено коефіцієнт Фішера – співвідношення амінокислот із розгалуженим бічним ланцюгом до тирозину. Встановлено існування певної кореляції між коефіцієнтом та вмістом альбуміну у крові, зокрема, його зниження вказує на порушення синтезу даного білка, наприклад, при хронічних хворобах печінки.

Дефіцит амінокислот із розгалуженим бічним ланцюгом розглядається як наслідок змін метаболізму азоту. За звичайних умов приблизно половина всього аміаку знешкоджується у циклі сечовини, натомість при пошкодженні

гепатоцитів, де локалізується цей процес, аміак вимушено надходить у скелетні м'язи. Тут відповідні амінокислоти трансамінуються з альфа-кетоглутаратом, утворюючи глутамат, який виступає субстратом для синтезу глутаміну за участі аміаку. Таким чином, виведення надлишкового аміаку відбувається шляхом посилення синтезу глутаміну у м'язовій тканині, що стає причиною нестачі амінокислот із розгалуженим бічним ланцюгом [20].

У зв'язку із цим пацієнтам з ураженням печінки з метою покращення детоксикації аміаку рекомендується вживати добавки амінокислот з розгалуженим ланцюгом. Таким чином, відбувається компенсація аліментарного дефіциту протеїнів та створюється джерело глутамату, який використовується в скелетних м'язах для виробництва глутаміну (рис. 1.2.1) [6].



**Рис. 1.2.1.** Механізми детоксикації аміаку у (А) циклі сечовини печінки, (В) шляхом синтезу глутаміну у м'язовій тканині [20]

На сьогодні до основних передумов розвитку квашіоркору відносять дефіцит харчових білків, енергетичних субстратів та мікроелементів, проте, єдиної думки щодо причини появи хвороби досі немає.

Найважливішим метаболічним порушенням за умов квашіоркору вважається стеатоз печінки. Дослідження за участі тварин дають підстави розглядати дефіцит харчового білка, зокрема метіоніну як донора метильної групи, визначальним фактором у розвитку захворювання. При цьому, штучне

додавання до раціону холіну, який здатен окислюватися до бетаїну (донора метильної групи), запобігає розвитку стеатозу. Дане явище пов'язується із підвищенням доступності холіну для утворення фосфатидилхоліну, що необхідний для утворення транспортної форми ліпідів з печінки – ЛПДНЩ. Окрім того, припускають, що холін бере участь у синтезі апопротеїну В100, який також входить до складу цієї транспортної форми [21].

Відомо, що за деяких фізіологічних станів потреба організму у протеїнах може зростати. При цьому, відповідно до літературних джерел, рекомендована щоденна потреба (0,8 г/кг) може становити зростати до 1-1,2 г/кг маси тіла. Сюди належить, зокрема, старіння, генетична схильність або медичні стани (гострі та хронічні хвороби, наприклад, рак або серцева недостатність), при яких виникає явище анаболічної резистентності, в основі якого знаходяться порушення травлення білків з наступним зниженням концентрації амінокислот у крові та порушення синтезу м'язових білків. Окрім того, за умов старіння посилюються процеси деградації м'язів, зокрема через гіподинамію наслідком чого стає атрофія. Підсумовуючи, зазначені стани стають основною причиною вищої фізіологічної потреби у харчових білках [22].

Іноді недостатнє харчування може стати причиною порушення функцій та захворювання печінки. Усе пов'язано з тим, що цикл сечовини потребує участі певних амінокислот (наприклад, орнітину, аспартату та аргініну) і цинкзалежних ферментів, які менш доступні в умовах нераціонального харчування. У зв'язку із цим пацієнтам із цирозом печінки за умови неможливості досягти нормального споживання білка рекомендується вживати харчові добавки, як додаткове джерело протеїну. Окрім цього, бажано приймати добавки цинку, який надзвичайно важливий для підтримки активності ензимів циклу сечовини [23].

Таким чином, нестача білка та, як наслідок, важливих мікроелементів, можуть стати причиною метаболічних розладів та залишаються важливою проблемою людства [18].

### 1.3. Особливості метаболізму аміаку в тканинах

#### 1.3.1. Основні шляхи утворення аміаку

Аміак належить до азотовмісних продуктів метаболізму, який в організмі людини основному виробляється, як побічний продукт метаболізму білків та внаслідок діяльності мікрофлори кишківника. При цьому більша частка цієї речовини використовується для повторного біосинтезу амінокислот та утворення сечовини, і лише незначна кількість переходить у кров [24, 25].

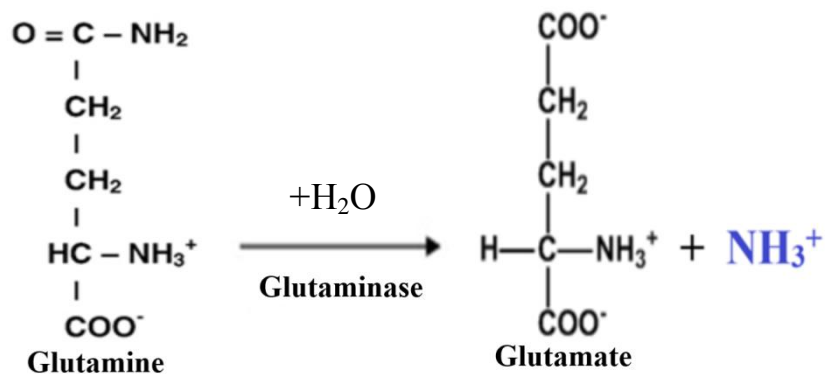
Найбільшими позапечінковими продуцентами аміаку є шлунково-кишковий тракт та нирки. У кишківнику джерелами утворення цього метаболіту слугують наступні процеси: гідроліз сечовини, дезамінування білків та перетворення глютаміну. Катаболізм сечовини відбувається за дії бактеріальної уреазы у порожнині кишківника. Частка розщепленої таким чином сечовини складає близько 20% від утвореної добової кількості, а звільнений аміак стає джерелом азоту для життєдіяльності бактерій.

Натомість основним джерелом аміаку у ШКТ вважається метаболізм глютаміну, який відбувається у клітинах слизової оболонки та включає деградацію за дії глютамінази (рис. 1.3.1). Загалом, відомо дві ізоформи даного ферменту: ниркового (GLS, також відому як GLS1) та печінкового типів (GLS2). Фосфат-залежна глютаміназа – це основний кишковий ензим, відповідальний за гідроліз глютаміну. Утворений при цьому глютамат може підлягати катаболізму з утворенням  $\text{CO}_2$  та ще однієї молекули аміаку або давати початок іншим амінокислотам [25-28].

Метаболізм аміаку у нирках істотно відрізняється від метаболізму інших речовин. Такий висновок, перш за все, можна зробити виходячи із різниці у концентраціях речовин в артеріальній та венозній системах органу. Продукція аміаку супроводжується його виходом у ниркову вену, а тоді у системний кровообіг. При цьому, надходження даного метаболіту із артеріальною кров'ю досить незначне. Описаний факт є прямо протилежним



до перетворення інших речовин, які в основному надходять артеріальним руслом [29].



**Рис. 1.3.1.** Реакція за участі глутамінази [30]

Метаболізм глутаміну виступає важливим механізмом знешкодження аміаку у нирках. Тут його перетворення починається із транспорту у мітохондрії, де специфічна ізоформа глутамінази каталізує продукцію глутамату та  $\text{NH}_4^+$ . Це так звана ниркова фосфат-залежна глутаміназа, яка активується фосфатом та локалізується на внутрішній мітохондріальній мембрані.

Наступним ензимом є глутаматдегідрогеназа (GDH) – це гексамерний білок, що складається з шести однакових субодиниць, об'єднаних по два тримери. Кожен тример включає три функціональних домени:  $\text{NAD}^+$ -зв'язувальний, для приєднання глутамату та регуляторний. Ензим здійснює зворотне дезамінування глутамату до  $\alpha$ -кетоглутарату та другої молекули  $\text{NH}_4^+$  з одночасним відновленням  $\text{NAD}(\text{Ф})^+$  до  $\text{NAD}(\text{Ф})\text{H}$  (рис. 1.3.2.). Оптимальне рН для прояву активності становить 7-8 [5, 29].

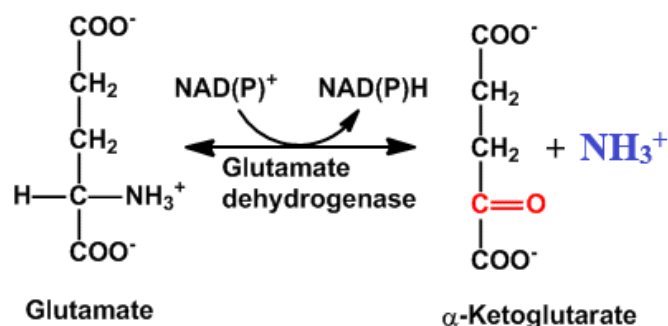
Відомо, що ензим належить до ключових регуляторів метаболізму аміаку у підшлунковій залозі, печінці та мозку. Зокрема, у гепатоцитах відзначається найвища активність даного ферменту серед усіх органів, а на його частку припадає близько 1% від загальної кількості білка.

Альфа-кетоглутарова кислота, утворена у ході каталізу, надходить у цикл Кребса, де використовується як субстрат [31]. До регуляторів GDH

належать пуринові нуклеотиди (ГТФ, АТФ і АДФ), НАДН, L-лейцин, пальмітил-КоА, спермідин та стероїдні гормони. Відповідно до літературних джерел дія ГТФ і АДФ полягає у впливі на динаміку НАД<sup>+</sup>-зв'язувального домену [5]. Таким чином, приєднання ГТФ буде перешкоджати руху домену та відкриттю каталітичної щілини. Натомість зв'язування АДФ буде сприяти обертанню цього домену та зменшенню енергії, необхідної для відкриття каталітичної щілини.

У ссавців глутаматдегідрогеназа – це високорегульований ензим із подвійною коферментною специфічністю, що дозволяє йому брати участь як у катаболічних, так і синтетичних процесах. Окрім того, даний фермент має складну систему алостеричної регуляції, необхідної для пристосування до мінливих умов. Вважається, що до найважливіших регуляторів належать ГТФ і АДФ, а тому активність GDH залежить від клітинних потреб в енергії. Пов'язуючи активність ензиму із циклом Кребса, ГТФ виступає його інгібітором.

Дані характеристики притаманні для GDH1 – білка, який зустрічається у більшості ссавців. Натомість у людини було виявлено ізофермент, що відрізняється функціональною адаптацією – hGDH2. Це пояснюється стійкістю до інгібування ГТФ через еволюційну заміну Gly456 на Ala. Така модифікація дає можливість ензиму працювати незалежно від циклу Кребса [5].

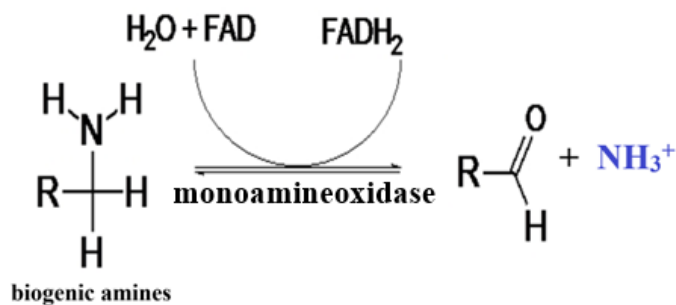


**Рис. 1.3.2.** Окисне дезамінування за участі глутаматдегідрогенази [32]

На сьогодні відомо, що GDH може брати участь у регуляції активності інших ензимів обміну аміаку. Зокрема, у разі підвищення її активності, у клітинах буде зменшуватися вміст N-ацетилглютамату, важливого алостеричного активатора карбамоїлфосфатсинтетази (CPS-I). Це, ймовірно, призводить до зменшення продукції сечовини в орнітиновому циклі та збільшення вільного аміаку [31].

Перетворення аміаку у м'язах визначається дією таких факторів як концентрація у крові та активність їх роботи [26]. Метаболізм амінокислот у печінці включає кілька стадій та завершується утворенням сечовини. На початковому етапі відбувається транс амінування амінокислот до глютамату. Далі він надходить у мітохондрії, де дезамінується за участі глютаматдегідрогенази. Утворений при цьому аміак використовується для синтезу сечовини [27].

Ще одним типом ензимів, залучених до утворення аміаку, є моноаміноксидази (MAO), які розташовані на зовнішній мембрані мітохондрій та каталізують реакцію окисного дезамінування нейромедіаторів та біогенних амінів (рис. 1.3.3).



**Рис. 1.3.3.** Окисне дезамінування нейромедіатора до відповідного альдегіду за дії MAO [33]

Даний білок існує у двох ізоформах – MAO-A та MAO-B, що експресуються у печінці, нирках, шлунку та серці. Зокрема, MAO-B виявляється саме у міокарді мишей та людини. Попри те, що як субстрат обидві форми використовують катехоламіни, вони все-таки відрізняються за субстратною специфічністю. При цьому, за участі MAO-A переважно

окислюються серотонін, дофамін та норадреналін, а MAO-B –  $\beta$ -фенілетиламін, дофамін та гістамін [34].

### 1.3.2. Механізми токсичності аміаку

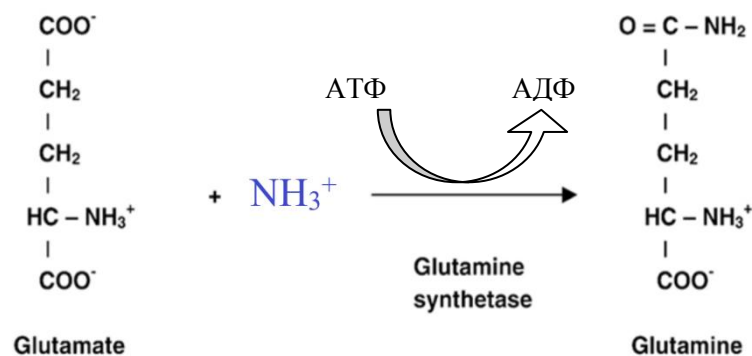
За умов нормального споживання білка в організмі дорослої людини щодня продукується приблизно 1000 ммоль аміаку, незначна частина якого може повторно використовуватися у процесах біосинтезу власних білків, креатину, поліамінів, нуклеотидів та інших речовин. Проте, більша частка аміаку все-таки повинна піддаватись ефективному видаленню аби уникнути наслідків токсичного ураження. Цьому сприяють високо регульовані та узгоджені процеси, забезпечуючи підтримку адекватного рівня даного метаболіту в організмі [35]. Зважаючи на це, надлишкова продукція або порушення знешкодження аміаку можуть зумовлювати метаболічні розлади [36].

Як було описано вище, за нормальних умов аміак перетворюється у печінці та виводиться нирками у складі сечовини. Однак порушення зазначеного процесу може стати причиною розвитку стану гіперамоніємії, що зумовлена накопиченням токсичного метаболіту у нефізіологічних концентраціях [37].

При гострій печінковій недостатності відзначаються високі рівні запальних цитокінів, які, як з'ясувалося, можуть порушувати гематоенцефалічний бар'єр [23]. За таких умов підвищення рівня аміаку може стати причиною його проникнення через бар'єр пропорційно до концентрації у крові. Як правило, причиною цього стає зниження активності циклу сечовини у печінці. Однак, існує ряд факторів, що можуть індукувати розвиток так званої непечінкової гіперамоніємії. Сюди належать мікробні інфекції (пневмонія), катаболічні стани, надмірні фізичні навантаження, травми, шлунково-кишкові кровотечі, приймання стероїдних препаратів [24].

Висока концентрація аміаку крові стає причиною його посиленого проникнення через гематоенцефалічний бар'єр [38]. Надійшовши у нервову

тканину аміак переходить у форму глутаміну за участі глутамінсинтетази астроцитів (рис. 1.3.4). Цей процес забезпечує короткотривале знешкодження надлишкового аміаку. Нейротоксичність, індуковану аміаком пов'язують із двома основними процесами. По-перше, з накопиченням глутаміну, який може стати причиною набряку тканини та, як наслідок, дисфункції нервових клітин. По-друге, активований за даних умов гідроліз глутаміну у мітохондріях ініціює посилення продукції активних форм кисню [24, 25].



**Рис. 1.3.4.** Реакція за участі глутамінсинтетази [39]

Разом з тим, відомо про негативний вплив аміаку на метаболізм нейромедіаторів у мозку. Даний ефект пов'язують із посиленням передачі гальмівного сигналу. Механізмом розвитку такого стану вважається вплив на бензодіазепінові рецептори, що призводить до посилення продукції нейростероїдів та експресії рецепторів  $\gamma$ -аміномасляної кислоти [25]. Надмірна стимуляція рецепторів та порушення регуляції транскрипції стають причиною порушення структури та подальшої загибелі нейронів [23].

Відомо, що у хворих на цироз печінки спостерігається підвищена активність фосфат-залежної глутамінази, а, отже, і більша продукція аміаку. Окрім того, зміни у мікробіоті ШКТ при цьому захворюванні також можуть провокувати надмірну продукцію аміаку бактеріями, що виділяють уреазу, наприклад, *Streptococcus salivarius* [25].

За нормальних умов аміак, утворений ШКТ, буде перетворюватися печінкою та скелетними м'язами у співвідношенні 1:1. Проте, у хворих на цироз, частка аміаку нейтралізованого м'язами зростає як компенсація

порушення детоксикаційної здатності печінки. Скелетні м'язи, при цьому, використовують надлишковий аміак для синтезу глутаміну. Відповідно до літературних джерел, такі зміни у детоксикаційній функції печінки при цирозі пов'язують зі зниженням активності цинкзалежного ензиму циклу сечовини – орнітинтранскарбамілази. Дане припущення було підтверджено експериментально за участі моделей цирозу печінки тварин та людей, у яких добавки цинку відновлювали втрачену активність ензимів циклу сечовини [20].

Відповідно до літературних джерел, близько 50% аміаку, утвореного у нирках, виводиться із сечею, а решта – потрапляє у системний кровообіг. Проте, за умов метаболічного ацидозу частка виділеного нирками аміаку може зростати до 70-80% [40]. За умов підвищеної концентрації аміаку відбувається активація синтезу глутаміну у клітинах ниркових каналців. Проте, відомо, що за умов гіпокаліємії та метаболічного ацидозу можлива активація глутамінази за для збереження калію або виділення водню відповідно [25].

На сьогодні існують дослідження, які підтверджують участь гіперамоніємії у розвитку окисного стресу та індукції апоптозу гепатоцитів. Ключовим активатором вказаних процесів вважається підвищення рівнів циклінів A та D1, які беруть участь у регуляції переходу між різними етапами клітинного циклу. Зокрема, циклін A необхідний для переходу клітини у S-фазу циклу, а D1 – забезпечує перехід G1/S. Таким чином, було з'ясовано роль підвищення концентрації аміаку в активації сигнальних шляхів, що ведуть до порушення клітинного циклу, апоптозу та, як наслідок, загибелі гепатоцитів [25, 41].

### **1.3.3. Ключові механізми знешкодження аміаку в організмі**

Утворення та виділення сечовини вважається головним шляхом знешкодження аміаку [26]. Натомість, у таких органах як мозок, скелетні

м'язи та шлунково-кишковий тракт, де відсутні ферменти циклу сечовини, цю функцію виконує глутамінсинтетаза [42].

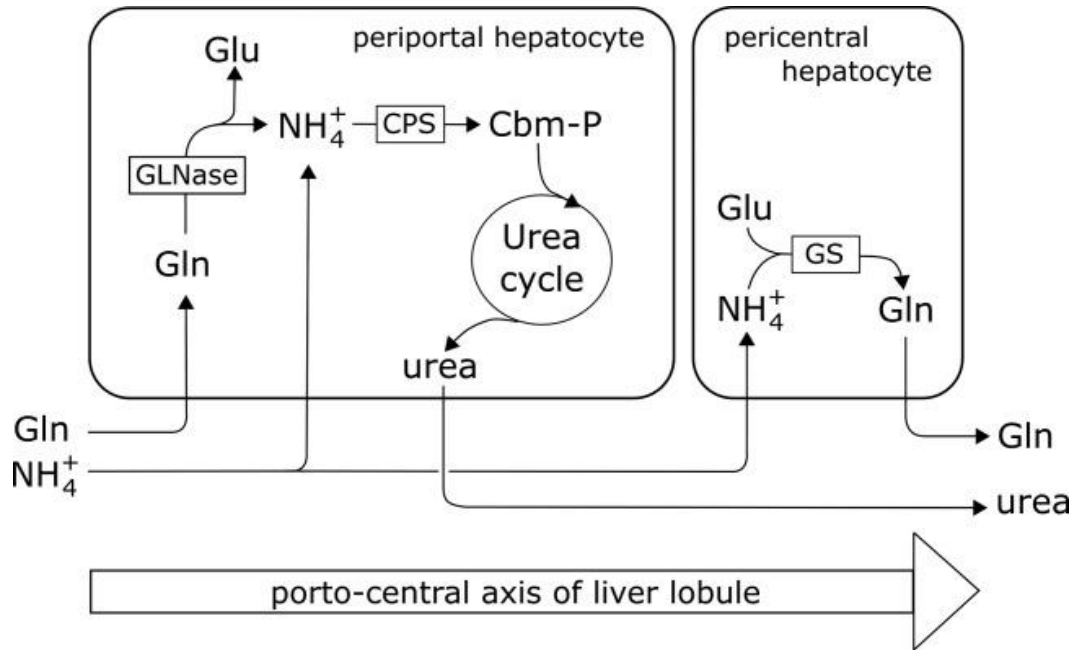
Аланін відомий як основне джерело карбону та нітрогену для м'язового метаболізму. Виходячи у кров, амінокислота згодом стає субстратом для глюконеогенезу у печінці. Основними попередниками для синтезу глутаміну та аланіну у м'язах виступають амінокислоти із розгалуженим ланцюгом, які трансамінуються у глутамат. Надалі можливе приєднання  $\text{NH}_3$  до глутамату за дії глутамінсинтетази, або трансамінування з піруватом до аланіну [27]. М'язи беруть участь у синтезі та виділенні всіх амінокислот, аланін та глутамін при цьому складають >50% від загальної кількості.

Амінокислота глутамін – це одна із найважливіших транспортних форм азоту в організмі. Відомо, що основним джерелом метаболіту виступають скелетні м'язи, підтримуючи сталу концентрацію цієї речовини у крові, а за умов ушкодження печінки виробництво глутаміну у скелетних м'язах стає основним способом детоксикації аміаку. Натомість ключову роль в утилізації глутаміну беруть нирки та шлунково-кишковий тракт, де амінокислота використовується як енергетичний субстрат. Тут метаболізм глутаміну включає перетворення за участі глутамінази з виділенням аміаку.

У печінці детоксикацію аміаку перш за все пов'язують з двома основними процесами: синтезом сечовини та глутаміну. На сьогодні відомо, що утворення та гідроліз глутаміну у печінці мають різну локалізацію. Так, перипортальні гепатоцити експресують глутаміназу, яка забезпечує дезамінування та утворення аміаку. Тут же відбувається його зв'язування у складі карбоаміоїлфосфату, що залучається у цикл сечовини. Натомість незначна частина аміаку використовується глутамінсинтетазою для продукції глутаміну, що відбувається виключно у перицентральных гепатоцитах [6, 43].

Карбоаміоїлфосфатсинтетаза – ключовий ензим орнітинового циклу, що володіє низькою спорідненістю до аміаку, проте кількісно переважає у гепатоцитах. При цьому, лише 7-10% центрально розташованих гепатоцитів експресують глутамінсинтетазу, яка реалізує альтернативний шлях

знешкодження, маючи високу спорідненість до цього метаболіту. Таким чином, обидва ензими завдяки різній локалізації та спорідненості до субстрату забезпечують максимальне зв'язування та знешкодження аміаку (рис.1.3.5) [6].



**Рис. 1.3.5.** Схема детоксикації печінкою аміаку у перипортальних та перицентральных гепатоцитах [43]

Більша частка глутаміну в організмі синтезується саме *de novo* за участі глутамінсинтетази, оскільки екзогенний, надійшовши ззовні, катаболізується в печінці. Даний ензим каталізує реакцію АТФ-залежного приєднання іона амонію до глутамату. Утворений таким чином глутамін забезпечує нейтралізацію двох молекул аміаку, а використання  $\alpha$ -кетоглутарату у цьому процесі погіршує функціонування циклу Кребса та мітохондрій у цілому. Окрім того, глутамінсинтетаза розглядається як центральний шлях метаболізму аміаку у скелетних м'язах, нирках та мозку. Зокрема, у мозку та скелетних м'язах активність ензиму посилюється у відповідь на гіперамоніємію, зв'язуючи надлишковий аміак. Найбільша активність спостерігається у легенях, м'язовій та жировій тканинах, де він має цитозольну локалізацію. Разом з тим, низька концентрація глутамінази цих



тканин робить їх основними джерелами синтезу та виділення глутаміну в кров [6, 44].

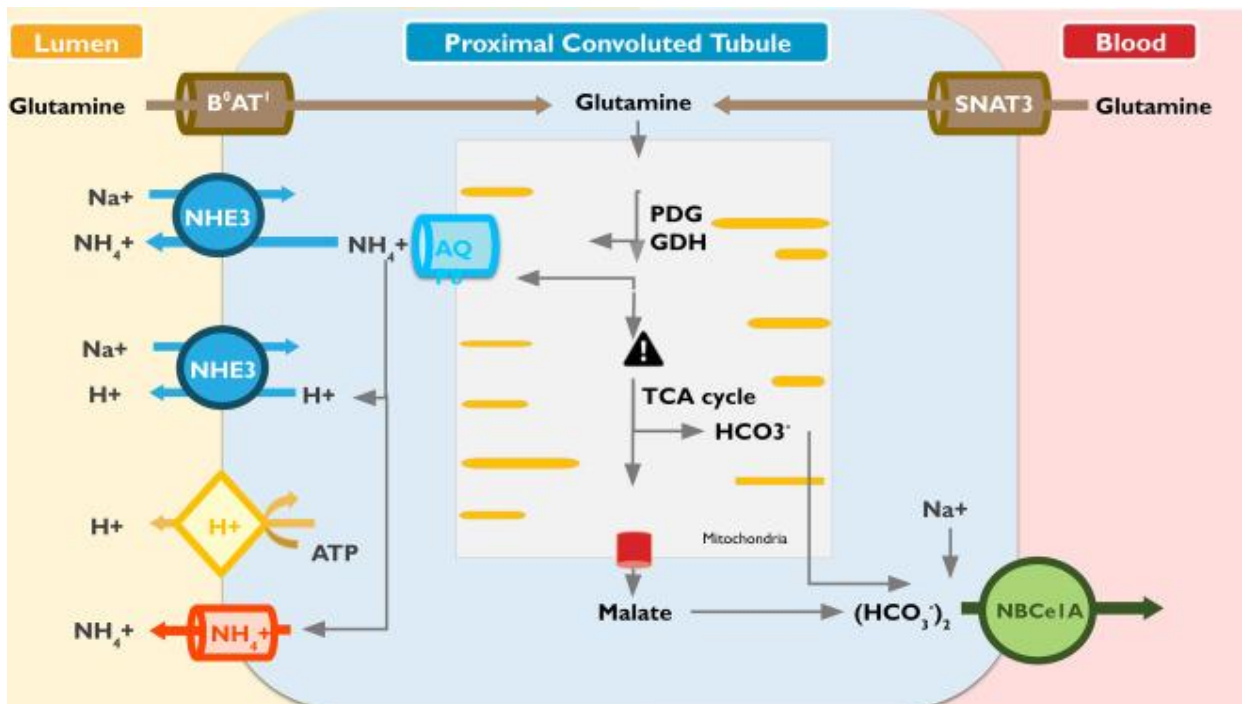
Однією з основних причин різкого підвищення рівня аміаку у внутрішньому середовищі організму може стати порушення функції нирок. Ключовий спосіб детоксикації аміаку у цьому органі – це синтез глутаміну у ниркових каналцях. Крім того, у нирках глутамін бере участь у гомеостазі калію та регуляції кислотно-лужного балансу [23]. Існування аміаку можливе у двох формах: у вигляді  $\text{NH}_3$  та іону амонію  $\text{NH}_4^+$ . При цьому за фізіологічних умов переважає саме  $\text{NH}_4^+$ , а частка  $\text{NH}_3$  складає всього 1,7%. Не зважаючи на те, що аміак є незарядженою сполукою, асиметричне розташування іонів водню навколо азоту у центрі обумовлює відносну полярність молекули у цілому. Завдяки цьому для аміаку характерна обмежена проникність через ліпідні мембрани та створення градієнта, що зустрічається, до прикладу, у нирках. Таки чином, транспорт молекули через мембрану може відбуватися тільки при участі специфічних білків транспортерів, що у нирках виконують важливу роль у виділенні аміаку [45].

Перетворення аміаку у нирках здійснюють саме проксимальні каналці, які здатні змінювати продукцію речовини у відповідь на метаболічний ацидоз. Основним джерелом аміаку є перетворення амінокислот, переважно глутаміну (рис. 1.3.6.) [29]. Стан метаболічного ацидозу стимулює катаболізм білків скелетних м'язів та синтез глутаміну печінкою. Тому, попри посилену деградацію цієї амінокислоти у нирках, у крові її концентрація зберігається на відносно сталому рівні. За таких умов відбувається зменшення маси скелетних м'язів та посилення виведення азоту з організму [17].

За умов ацидозу або гіпокаліємії посилюється експресія ниркової глутамінази для гідролізу глутаміну. Це дозволяє виводити надлишок кислоти у клубочковий фільтрат або поглинати калій з нього [23]. Перетворення тут цієї молекули, за участі глутамінази та глутаматдегідрогенази дає  $\alpha$ -кетоглутарат та дві молекули  $\text{NH}_4^+$  [29]. Іон амонію при цьому стає донором протона, який шляхом антипорту з калієм

забезпечує його зворотний транспорт та подальше відновлення кислотно-лужної рівноваги. Таким чином, метаболізм глутаміну виступає важливим механізмом знешкодження аміаку у нирках [23].

Наступним логічним кроком для здійснення регуляції кислотно-основної рівноваги є продукція бікарбонату. Продукований на попередньому етапі  $\alpha$ -кетоглутарат стане субстратом для синтезу малату, який, вийшовши у цитозоль, перетвориться до фосфоенолпірувату. Останній метаболіт є джерелом пірувату, що залучається або у цикл Кребса та утворює  $\text{HCO}_3^-$ , або у гліюконеогенез, продукуючи глюкозу та  $\text{HCO}_3^-$ . Утворений на даному етапі бікарбонат через базолатеральну мембрану надходить у кровоносні капіляри [29]. Надалі аміак буде транспортуватися за допомогою різних білків-переносників через апікальну поверхню клітин. Таким чином, інтеграція процесів продукції та транспорту аміаку лежить в основі регуляції метаболізму цієї речовини у нирках [29, 46].



**Рис. 1.3.6.** Механізм перетворення глутаміну до аміаку та бікарбонату в проксимальному звивистому каналці нирок [47]

Проте, відомо, що не весь аміак, утворений у нирках, надалі виводиться. Певна частка може використовуватися глутамінсинтетазою, яка протидіє виведенню цього метаболіту, таким чином забезпечуючи його

рециркуляцію. Активність даного ензиму може змінюватися за таких станів, як метаболічний ацидоз, гіпокаліємія та обмеження споживання протеїну. Зокрема, дослідження, проведені раніше, показують, що метаболічний ацидоз стає причиною зниження експресії та активності глутамінсинтетази [46].

Відомо, що тривалі зміни кислотно-основної рівноваги регулюються відповідними модифікаціями на рівні експресії генів, які кодують основні білки метаболізму глутаміну [44]. На сьогодні існують дослідження, які підтверджують важливість участі глутамінсинтетази у регуляції кислотно-основного гомеостазу та азотного метаболізму у нирках. Це обумовлюється, з одного боку, продукцією незамінної кислоти глутаміну, яка необхідна для синтезу білка, а з іншого – підтримкою азотистої рівноваги. Відомим є факт підвищення експресії глутамінсинтетази у проксимальних канальцях за умов обмеження споживання білка. Це може свідчити про те, що посилена рециркуляція аміаку за даних умов знижує аміакогенез та, як наслідок, виведення аміаку. Проте, це правило не завжди справджується, адже метаболічний ацидоз здійснює протилежний ефект. Наприклад, за умов споживання білка з високою часткою сірковмісних амінокислот, як от цистеїну, буде спостерігатися посилення ендогенної продукції та екскреції кислот [48].

## РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкти та методи досліджень

Дослідження здійснювали за участі білих безпородних щурах масою 120-140 г та віком 2-2,5 місяці. Всі дії над тваринами проводилися відповідно до вимог міжнародної конвенції «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Токсичне ураження моделювали шляхом введення *per os* експериментальним тваринам парацетамолу з розрахунку 1250 мг/кг (0,5 LD<sub>50</sub>) маси тварин у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю 1 раз на день протягом 2 діб [49].

Відповідно до моделі дослідження тварин поділяли на групи:

I група – щурі, яких утримували на повноцінній напівсинтетичній дієті (К);

II група – щурі, яких утримували на напівсинтетичній низькопротеїновій дієті (1/3 добової потреби білка) (НПР);

III група – щурі, яким моделювали гостре парацетамол-індуковане токсичне ураження (ТУ);

IV група – щурі, яким моделювали гостре парацетамол-індуковане токсичне ураження на фоні аліментарної депривації протеїну (НПР/ТУ) [49].

Тварини отримували щоденно 35 г суміші з розрахунку 200 г/кг маси тварини та мали вільний доступ до води. “Напівсинтетична дієта включала наступні компоненти: крохмаль – 620,69 г/кг; казеїн – 140 г/кг; сахароза – 100 г/кг; олія – 40 г/кг; целюлоза – 50 г/кг; сольова суміш (фосфорнокислий калій одно заміщений (KHPO<sub>4</sub>) – 163 г, вуглекислий кальцій (CaCO<sub>3</sub>) – 160,2 г, хлористий натрій (NaCl) – 58,5 г, сірчаноокисле залізо (FeSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O – 11,1 г, сірчаноокислий магній (MgSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O) – 24,1 г, сірчаноокислий марганець (MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O) – 1,87 г, йодистий калій (KI) – 0,322 г, сірчаноокислий цинк

( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) – 0,23 г, фтористий натрій (NaF) – 0,21 г, сірчаноокисла мідь ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) – 0,2 г, алюмокалієві квасці ( $KAl(SO_4) \cdot 12H_2O$ ) – 0,047 г, хлористий кобальт ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) – 0,01 г); вітамінна суміш (нікотинова кислота – 30 мг, кальцій пантотенат – 15 мг, піридоксин – 6 мг, тіамін – 5 мг, рибофлавін – 6 мг, фолієва кислота – 2 мг, вітамін –  $B_{12}$  – 25 мг, вітамін К – 860,0 мг, вітамін Е – 75 МО, вітамін А – 4000,0 МО, вітамін D – 1000 МО)” [50].

Кожні 3 дні від початку експерименту проводили зважування тварин. Експеримент тривав протягом 28 днів. Декапітацію тварин проводили під дією легкого ефірного наркозу.

### **Виділення сироватки крові**

Збір крові здійснювали у пробірки з антикоагулянтом (1 об'єм 4 % розчину цитрату натрію до 9 об'ємів крові). Сироватку виділяли шляхом центрифугування крові протягом 30 хв при 1500 g за температури +4 °C. Отриманий центрифугат, що відбирали, і є сироваткою крові [51].

### **Визначення концентрації глутаміну у сироватці крові**

Концентрацію глутаміну визначали за допомогою автоматичного аналізатора амінокислот Т-339 (Microtechnology, Чехія) на базі Інституту біохімії ім. Палладіна НАН України з постколонковою дериватизацією за дії нінгідрину [52].

### **Визначення залишкового азоту у сироватці крові**

Принцип методу ґрунтується на взаємодії азоту всіх азотовмісних речовин сироватки крові із сульфатною кислотою з утворенням сульфату амонію, який з реактивом Несслера утворює сполуку жовто-помаранчевого кольору. Інтенсивність забарвлення порівнюється зі стандартом.

Отримання безбілкового фільтрату: у пробірку додають 2,8 мл 10 % ТХО та 0,2 мл сироватки крові. Потім перемішують, залишають на 15 хв та центрифугують 5-10 хв при 3000 об/хв.

Мінералізація: у термостійку пробірку відбирають 0,5 мл супернатанту та додають 0,05 мл концентрованої сульфатної кислоти. Проводять спалювання на пісочній бані до появи бурого забарвлення. Пробірки охолоджують та додають по 2 краплі концентрованого пероксиду водню, ставлять на баню до знебарвлення рідини. В охолоджені пробірки додають 10 мл кип'яченої дистильованої води та 12,5 М NaOH до слабколужної реакції (перевіряється забарвленням лакмусу у синій).

Кольорова реакція: у пробірку вносять 0,5 мл реактиву Несслера, розчин забарвлюється у жовтий колір, інтенсивність якого пропорційна вмісту азоту.

Проводять вимірювання при 440-450 нм. Розрахунок проводять за формулою [53].

### **Визначення концентрації аміаку у сироватці крові**

У пробірки вносять 5 мл води, 20 мкл сироватки та 200 мкл реактиву Несслера, перемішують та залишають на 10 хв. Проводять вимірювання при 410 нм. Аналогічно готують стандартну пробу, яка замість сироватки включає 20 мкл стандартного розчину (100 мкг азоту/мл), контрольна містить 20 мкл води. Кількість аміаку визначають за формулою [54].

### **Виділення мітохондріальної фракції**

Мітохондріальну фракцію печінки та нирок отримували методом диференційного центрифугування. Етапи виділення проводили за температури 0-4 °С. Перший етап включав гомогенізацію тканин шляхом їх поміщення у ступку та подрібнення до однорідної консистенції, після чого додавали буфер А. Середовище гомогенізації включало 250 мМ сахарози, 30 мМ Трис-НСІ, 1 мМ EDTA, рН 7,4. Гомогенат фільтрується у пробірки та

центрифугували при швидкості 1000g протягом 10 хв з метою осадження ядер та уламків клітин. Отриманий супернатант відбирали для подальшого центрифугування при 12000 g протягом 10 хв. Утворений осад ре суспендували у 5 мл буферу, що містить 250 мМ сахарози, 30 мМ Трис-НСІ, рН 7,4, та центрифугували при 12000 g протягом 10 хв. Виділений осад мітохондрій повторно промивали буфером [55].

**Вміст білка** у зразках визначали за методом Лоурі.

### **Визначення загальної глутаміназної активності**

Визначення загальної глутаміназної активності нирок включає інкубацію у фосфатному середовищі: 0,3 мл мітохондріальної фракції вносять у пробірку, де знаходиться реакційне середовище, яке містить 0,6 мл 0,05 М Трис-НСІ буфера (рН 7,4), 0,3 мл 0,1 М глутаміну, 0,3 мл Н<sub>2</sub>О і 1,5 мл 0,1 М натрій-фосфатного буфера (рН 7,4). Пробірки перемішують на водяній бані при 37 °С протягом 30 хв. Інкубація в безфосфатному середовищі проводиться аналогічно, при цьому, фосфатний буфер замінюється на 1,5 мл Н<sub>2</sub>О [56].

Концентрація аміаку виділеного у ході реакції визначається за калібрувальною кривою [57]. Активність ензиму виражають у ммоль NH<sub>3</sub>/хв на мг протеїну.

### **Визначення глутаматдегідрогеназної активності**

Метод заснований на визначенні зміни кількості відновленого NAD<sup>+</sup>, що відповідає концентрації використаного субстрату у ході реакції. Реєстрацію здійснювали спектрофотометрично кожні 15 с протягом 2 хв при довжині хвилі 340 нм.

Інкубаційне середовище об'ємом 2,7 мл містило 0,6 мл 0,25 М трис-НСІ (рН 8,2), 0,3 мл 10<sup>-3</sup> М ЕДТА, 1,7 мл Н<sub>2</sub>О, 0,1 мл 18×10<sup>-4</sup> М NAD<sup>+</sup>. У кювету вносять 0,1 мл суспензії мітохондрій. Реакція запускається внесенням 0,2 мл 0,75 М розчину глутамінової кислоти.

Оптичну густину вимірювали кожні 15 с протягом 2 хв. Активність ензиму розраховували за формулою  $X = \Delta E V \times 1000 / 6,22 \alpha$ , де  $\Delta E$  – зміна оптичної густини розчину за 1 хв,  $V$  – кінцевий об'єм проби (3 мл),  $\alpha$  – кількість білка в пробі за методом Лоурі, мг [58].

### **Визначення глутаміназної активності**

Глутаміназну активність визначали у мітохондріальній фракції печінки за кількістю виділеного аміаку.

Реакційне середовище об'ємом 2 мл включало 50 мМ трис- HCl (pH 8,05), 100 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 мкг білка мітохондрій. Реакцію починали внесенням 0,1 мл 2,05 мМ глутаміну. Інкубацію проводили протягом 30 хв, реакцію зупиняли додаванням 0,1 мл 60% ТХО [51].

Концентрацію аміаку, виділеного у ході реакції, визначали за калібрувальною кривою [57]. Активність ензиму виражали у ммоль  $\text{NH}_3$ /хв на мг протеїну.

### **Визначення карбомілфосфатсинтетазної активності**

Активність ензиму визначали за кількість утвореного неорганічного фосфату у реакційному середовищі, яке містило 10 мкМ АТФ, 35 мкМ  $\text{MgSO}_4$ , 35 мкМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 30 мкМ  $\text{NaHCO}_3$ , 60 мкМ глутамату. Після години інкубації при 37 °С реакцію зупиняли внесенням 1 мл 20 % ТХО. Вміст пробірок центрифугували 15 хв при 2500 об/хв. [51].

Вміст неорганічного фосфору в супернатанті визначали стандартним методом Фіске-Суббароу [58].

Активність ензиму розраховували за калібрувальним графіком та виражали у нмоль  $\text{P}_i$  / хв на мг протеїну.

### **Визначення моноаміноксидазної активності**

Активність ензиму вимірюється спектрофотометрично за зростанням кількості бензальдегіду у реакційному середовищі при 250 нм. Інкубаційна



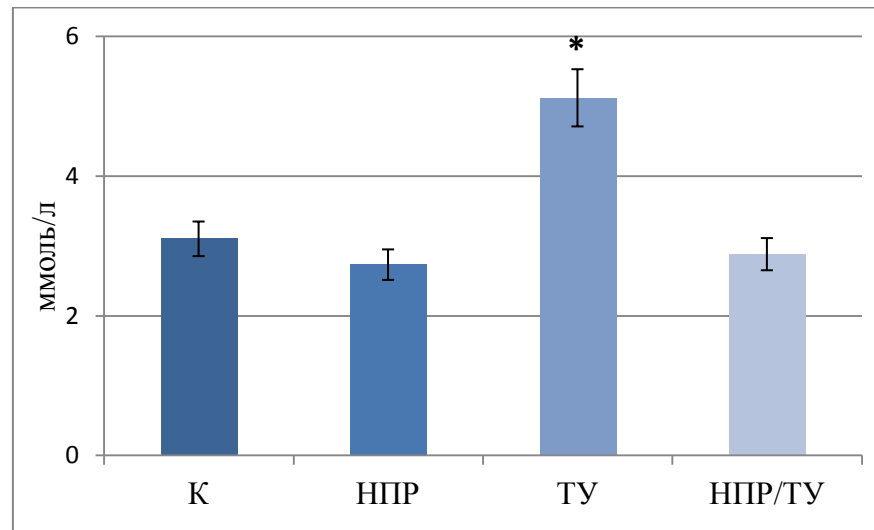
суміш об'ємом 3 мл містила 3,3 мМ бензиламіну та 0,20 М фосфорного буферу, рН 7,2. Реакцію починали внесенням 100 мкл фракції мітохондрій. Питому активність визначали як кількість одиниць активності ензиму на 1 мг білка. Одиниця активності ензиму визначається як кількість ензиму, що прискорює зміну абсорбції на 0,001 аб. од. за 1 хв при 250 нм [51].

**Статистична обробка результатів** здійснювалась на персональному комп'ютері з використанням редактора "Excel 2007 for Windows", методом варіаційної статистики, обробки результатів досліджень із застосуванням t-критерія вірогідності різниці Стюдента. Різниця вважалась достовірною при коефіцієнті вірогідності  $p < 0,05$ .

### РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що аміак є токсичним за умови підвищення його концентрації. Підвищення концентрації аміаку, що найчастіше пов'язують з пошкодженням тканини печінки, призводить до стану гіперамоніємії. Оскільки аміак є сильним нейротоксином, то підвищення його вмісту у крові може стати причиною серйозних неврологічних розладів. На сьогодні розрізняють вроджену та набуту форми гіперамоніємії. Причиною набутої форми є захворювання печінки, спричинені екзогенними факторами, зокрема, прийомом гепатотоксинів [3]. Біохімічними показниками, які свідчать про формування стану гіперамоніємії, є підвищення вмісту залишкового азоту, нітрогену аміаку та глютаміну у сироватці крові.

Результати проведених досліджень показали, що достовірне підвищення рівня залишкового азоту спостерігається лише у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном, які перебували на повноцінному харчуванні (рис. 3.1).



**Рис. 3.1.** Вміст залишкового азоту у сироватці крові щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

*Примітка (тут і надалі): К – тварини, які отримували повноцінний напівсинтетичний раціон (контроль); НПР – тварини, які перебували на низькопротеїновій дієті; ТУ – тварини, яким моделювали токсичне ураження; НПР/ТУ – тварини, яким на тлі низькопротеїнового раціону моделювали токсичне ураження; \* – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем,  $P < 0,05$ .*

Водночас у щурів за умов дефіциту протеїну у раціоні чи з токсичним ураженням на тлі аліментарного дефіциту протеїну значення цього показника порівняно з контролем достовірно не змінюється.

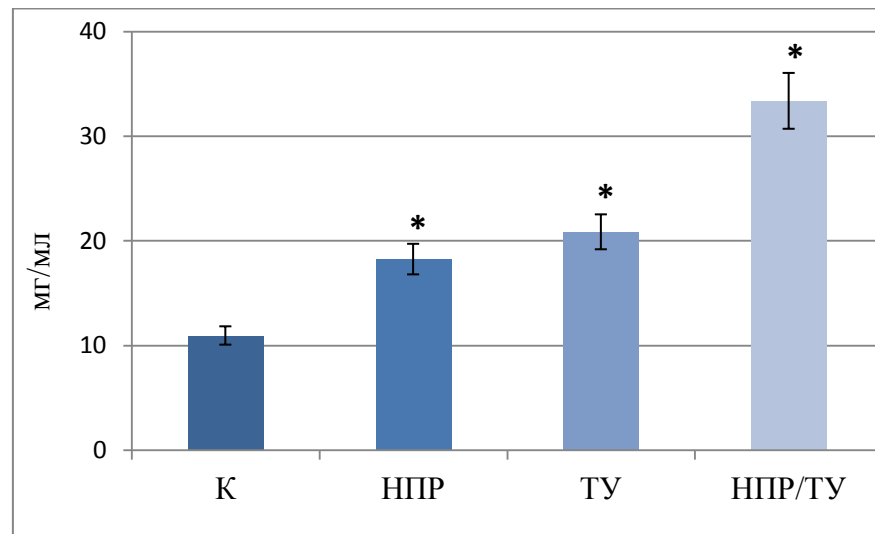
Під залишковим азотом розуміють сукупність азоту сечовини (~ 50%), амінокислот (~25%), з яких частка глутаміну переважаюча, креатину та креатиніну (до 7,5%), пептидів, нуклеотидів та азотистих основ (~ 5%), сечової кислоти (до 4%), аміаку та індикану (0,5%) [59].

Сечовина виступає основним продуктом азотного обміну в організмі і разом з цим складає найбільшу частку залишкового азоту. Саме тому зміна кількості сечовини у крові найбільшою мірою впливатиме на цей показник. Попередніми дослідженнями кафедри було показано [53], що у групі НПР/ТУ за досліджуваних умов вміст сечовини у сироватці крові знижується, проте встановлене підвищення вмісту глутаміну (рис. 3.2) може пояснити збереження вмісту залишкового азоту на рівні контролю у тварин цієї групи. Значну частину залишкового азоту складають амінокислоти, зокрема, глутамін та аланін, які розглядаються як транспортні форми аміаку від тканин до печінки та нирок [4].

Водночас наші дослідження показали підвищення вмісту глутаміну (рис. 3.2) у тварин груп ТУ, що пояснює підвищення вмісту залишкового азоту у тварин цієї групи. Глутамін є важливим попередником у синтезі таких молекул як амінокислоти (глутамат), метаболіти циклу Кребса ( $\alpha$ -кетоглутарат) і нуклеотиди (АМФ, пурини та піримідини). Тому глутамін має важливе значення для енергетичного обміну та проліферації гепатоцитів. До того ж ця амінокислота є попередником для синтезу глюкози у ході глюконеогенезу та дозволяє підтримувати нормальний рівень глюкози в умовах голодування після виснаження запасів глікогену [60].

Отримані результати, ймовірно, свідчать про перерозподіл між окремими компонентами залишкового азоту у групі НПР/ТУ за умов збереження його загального вмісту.

Однією із причин підвищення рівня залишкового азоту крові може бути порушення клубочкової фільтрації у нирках. Іншою вагомою причиною є високий катаболізм білка [61, 62].



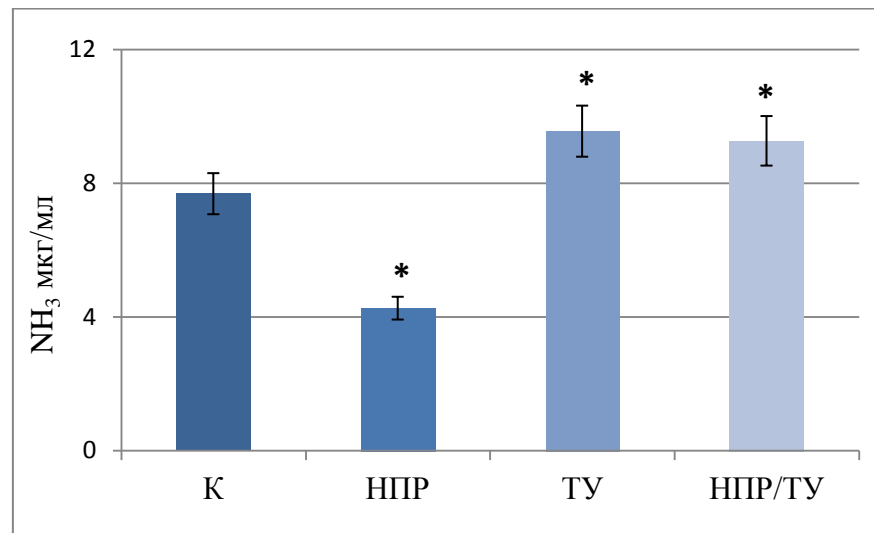
**Рис. 3.2.** Вміст глютаміну у сироватці крові щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Визначення вмісту нітрогену аміаку показало, що значне зниження рівня цього показника спостерігається у тварин, які споживали низькопротеїновий раціон. Зниження рівня аміаку сироватки крові у групі НПР, ймовірно, пов'язане зі нестачею азоту через споживання низькопротеїнового раціону. Натомість зростання даного показника спостерігається у групах щурів, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном та токсичне ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну (рис. 3.3), що свідчить про формування стану гіперамоніємії за досліджуваних умов.

У нормі концентрація аміаку крові лімітується функціонуванням орнітинового циклу. Проте, за умов порушення цього процесу, аміак може накопичуватися в організмі у високих концентраціях, негативно впливаючи на нервову діяльність. При цьому надлишок аміаку буде пригнічувати активність циклу Кребса шляхом вилучення  $\alpha$ -кетоглутарату на синтез глютамату [63].

Таким чином, виявлена нами гіперамоніємія у групах ТУ та НПР/ТУ, ймовірно, сприятиме енергетичному дисбалансу у гепатоцитах, що у свою чергу призведе до порушення енергозалежних процесів у клітинах, у тому числі функціонування орнітинового циклу.

Отримані результати свідчать про підвищення вмісту аміаку у тварин із токсичним ураженням, незалежно від білкового харчування, причиною чого може бути або посилення утворення аміаку, або порушення його знешкодження.



**Рис. 3.3.** Вміст нітрогену аміаку у сироватці крові щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Отже, за умов токсичного ураження ацетамінофеном у сироватці крові підвищується вміст як залишкового азоту, так і нітрогену аміаку, тоді як у тварин з інтоксикацією ацетамінофеном на тлі білкової недостатності підвищується вміст лише нітрогену аміаку та зберігається на рівні контролю вміст залишкового азоту у сироватці. Ймовірно, отримані результати свідчать, що за досліджуваних умов посилюється утворення аміаку, проте порушується процес утворення нетоксичних азотовмісних метаболітів, зокрема, сечовини.

Відомо, що вміст аміаку та азотовмісних продуктів залежить від співвідношення швидкості їх утворення та швидкості детоксикації і

виведення нирками. Ключовими ензимами утворення аміаку є глутаміназа, глутаматдегідрогеназа (hGDH1) та моноаміноксидаза (MAO) [25].

Глутаміназа (ЕС 3.5.1.2) відома як основний ензим, відповідальний за розщеплення глутаміну з утворенням глутамату та іона амонію. За таких умов, як знижене споживання амінокислот та/або вуглеводів, виражені катаболічні стани, хвороби або стрес, печінка може стати основним місцем гідролізу глутаміну. Порівняно з нормальною функцією печінки, при цирозі буде спостерігатися підвищена активність даного ензиму, що призведе до посиленого утворення аміаку [25].

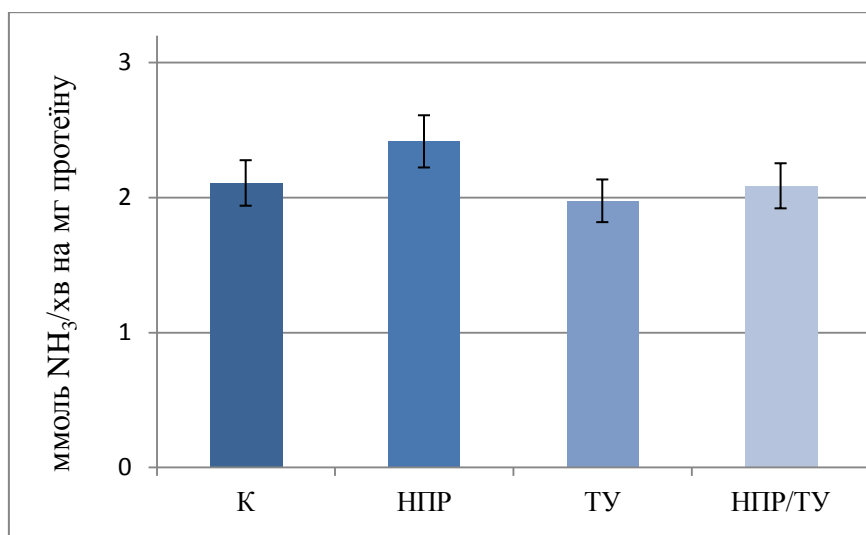
Моноаміноксидаза (MAO, ЕС 1.4.3.4) – це ензим, що локалізований на зовнішній мембрані мітохондрій та здійснює перетворення біогенних амінів на аміак та альдегіди з виділенням пероксиду водню [64].

У гепатоцитах тварин переважає експресія форми hGDH1 (ЕС 1.4.1.3), натомість hGDH2 практично відсутня. Це дає можливість стверджувати про переважаючу роль саме hGDH1 у глутаматдегідрогеназній активності печінки. Ензим каталізує окисне дезамінування глутамату до  $\alpha$ -кетоглутарату та аміаку. Характерна локалізація ензиму – мітохондріальний матрикс [5].

Результати проведених досліджень показали збереження глутаміназної активності мітохондрій печінки тварин усіх дослідних груп на рівні контролю (рис. 3.4). Отримані результати, ймовірно, свідчать, що за досліджуваних експериментальних умов показане нами підвищення вмісту нітрогену аміаку у тварин групи ТУ, НІР/ТУ не пов'язане із посиленням розщеплення глутаміну у печінці.

Отже, печінкова ізоформа глутамінази не робить вклад у вміст аміаку у сироватці крові за умов інтоксикації ацетамінофеном.

Відомо, що глутамін є транспортною формою аміаку від тканин не тільки до печінки, але і до нирок. За умов порушення кислотного стану у нирках може посилюватися дезамінування глутаміну за участі глутамінази.

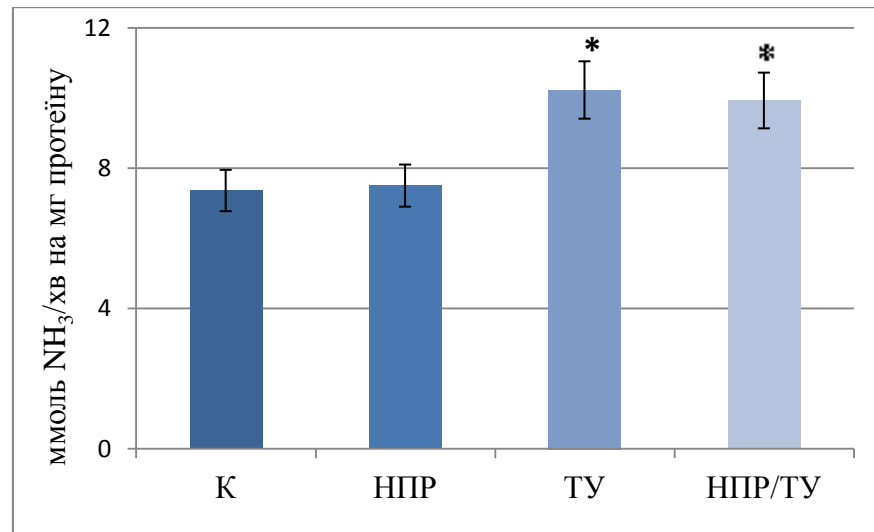


**Рис. 3.4.** Глутаміназна активність у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Результати досліджень показали, що у мітохондріях нирок тварин, які перебували на низькопротеїновому раціоні, загальна глутаміназна активність не змінюється порівняно з контролем (рис. 3.5). Проте, у групі ТУ спостерігається достовірне підвищення досліджуваної ензиматичної активності відносно контролю. Аналогічні зміни характерні для тварин групи НПР/ТУ. Ймовірно, що встановлені зміни свідчать про порушення кислотно-основного балансу за умов інтоксикації ацетамінофеном. Відомо, що підвищення активності глутамінази нирок може спостерігатися при ацидозі. Таким чином, аміак у формі амонію може забезпечувати виведення надлишкової кислоти шляхом ниркової секскреції, що необхідно для відновлення кислотно-основного гомеостазу [65].

Враховуючи, що глутамін є транспортною формою аміаку від тканин до печінки та нирок, встановлений факт вказує на ймовірне посилене утворення аміаку у тканинах та порушення його знешкодження за досліджуваних експериментальних умов.

Отже, за умов токсичного ураження ацетамінофеном, не залежно від забезпеченості протеїном, спостерігається підвищення загальної глутаміназної активності нирок.



**Рис. 3.5.** Загальна глутаміназна активність у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

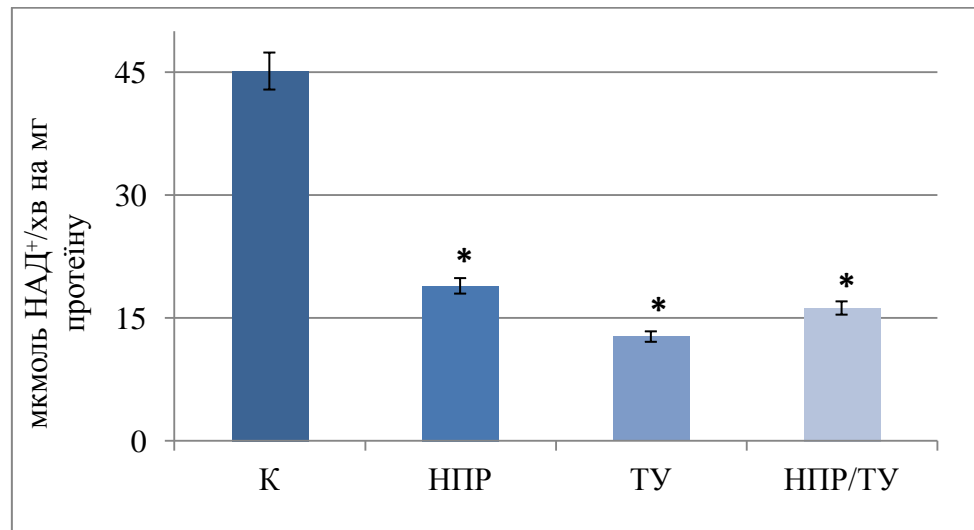
Відомо, що приблизно 50 % аміаку, утвореного нирками, виводиться у незмінному вигляді, інша частина надходить у ниркові вени та метаболізується у печінці до сечовини. В умовах ацидозу збільшується утворення та виведення аміаку нирками [65]. При цьому спостерігається індукція трьох ключових ензимів: мітохондріальної глутамінази і глутаматдегідрогенази, цитозольної фосфоенолпіруваткарбоксікінази. У реакціях, каталізованих даними ферментами, на одну молекулу глутаміну утворюються по дві молекули амонію та бікарбонату.

На сьогодні відомо, що механізм ниркової секреції амонію перш за все визначається локалізацією даного процесу. Зокрема, у проксимальному відділі виділення амонію відбувається в обмін на натрій, який при цьому поглинається із просвіту каналця. Натомість, у збірних протоках реалізується інших спосіб – аміак шляхом дифузії виходить у просвіт каналу, де зв'язується із секретованим воднем, утворюючи амоній. Таким чином ниркова екскреція амонію забезпечує виведення надлишкової кислоти та відновлення порушеного кислотно-окисного гомеостазу [66].

Іншим ферментом, який бере участь у продукуванні аміаку у печінці, є глутаматдегідрогеназа. Нами встановлено, що у всіх дослідних груп



глутаматдегідрогеназна активність у мітохондріальній фракції печінки знижується (рис. 3.6). Ймовірно, що за умов споживання низькопротеїнового раціону зниження глутаматдегідрогеназної активності може бути пов'язано з виснаженням пулу глутамату у тварин за умов нестачі білка у раціоні, оскільки відомо, що саме глутамат використовується для утворення замісних амінокислот у реакціях трансамінування [67].



**Рис. 3.6.** Глутаматдегідрогеназна активність у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

Відповідно до літературних джерел [68], активність ферменту залежить від концентрації субстрату, рН середовища та іонної сили. Так, було встановлено, що оптимальним для hGDH1 є рН 7,75, а підкислення середовища при поглинанні глутамату (умови ацидозу) гальмує реакцію амінування  $\alpha$ -кетоглутарату, активуючи дезамінування глутамату.

З одного боку під час метаболічного ацидозу перетворення глутамату спрямовується на транспорт аміаку у нирки. При цьому глутаміназа перипортальних гепатоцитів пригнічується, а основна частка аміаку та глутамату надходить у перицентральної клітини, де використовується для синтезу глутаміну, який своєю чергою спрямовується у нирки [68].

Отже, глутамат, що за звичайних умов перетворюється в основному глутаматдегідрогеназою, за умов порушення кислотно-основного стану

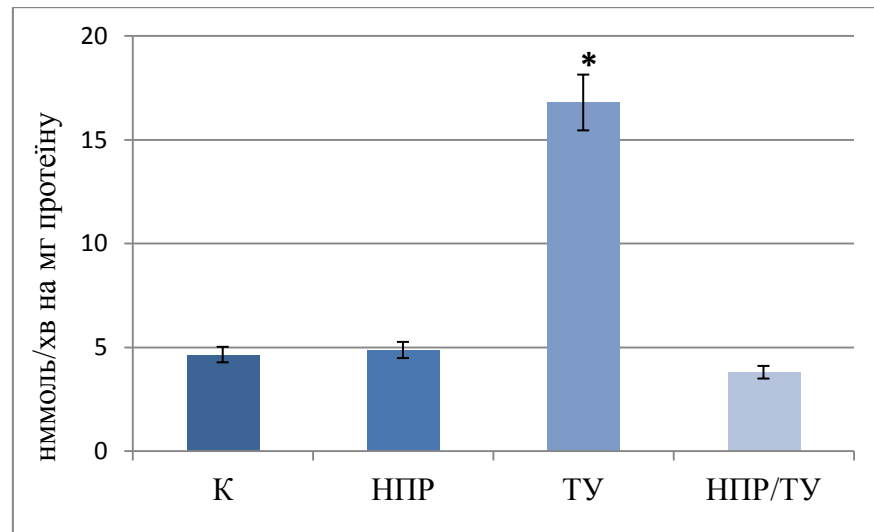
використовується для синтезу глутаміну. Таким чином, зростання концентрації глутаміну крові корелює зі посиленням ацидозу та необхідне для видалення надлишкових іонів водню з метою стабілізації кислотно-основного стану.

З іншого боку, відбувається вилучення  $\alpha$ -кетоглутарату із циклу Кребса та залучення у відновне амінування глутаматдегідрогеназою для поповнення пулу глутамату. Таким чином, нестача  $\alpha$ -кетоглутарату призведе до сповільнення циклу Кребса, а також реакцій окисного фосфорилування шляхом відтоку електронів від комплексу III дихального ланцюга мітохондрій з подальшим утворенням АФК, що викликають ушкодження клітин і аутофагію [67, 69].

Крім того, глутамат може використовуватися аспаратамінотрансферазою, у зворотній реакції з утворенням аспартату, замінної амінокислоти. Таким чином оборотні реакції глутаматдегідрогенази та аспаратамінотрансферази можуть змінюватися у відповідному напрямку залежно від клітинних потреб, зокрема, циклу сечовини [70].

Водночас нами встановлено, що підвищення моноамінооксидазної активності у мітохондріях печінки спостерігається тільки за умов введення токсичних доз ацетамінофену (рис. 3.7). Відомо, що MAO забезпечує знешкодження біогенних амінів, перетворюючи їх до альдегідів з вивільненням аміаку та пероксиду водню [71].

У літературі показано, що пероральний прийом ацетамінофену може призвести до підвищення концентрації у сироватці крові одного із біогенних амінів – серотоніну [71], який потім метаболізується з утворенням аміаку, що може пояснити показане ними підвищення цього показника за умов введення ацетамінофену. У такому разі наслідком підвищеної активності MAO може стати участь пероксиду водню в утворенні інших активних форм кисню, здатних пошкоджувати клітинні мембрани, у тому числі мітохондрій, викликаючи загибель клітин [64].



**Рис. 3.7.** Моноаміноксидазна активність у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

У літературі показано, що гепатотоксичність ацетамінофену перш за все пов'язана із впливом на роботу білків мітохондрій. Однією із мішеней його дії виступають комплекси I/II мітохондріального електротранспортного ланцюга. При цьому, порушення їх роботи зумовлює витік електронів та появу супероксидних радикалів. У подальшому дані АФК можуть вступати у реакцію дисмутації за участі супероксиддисмутази до пероксиду водню і молекулярного кисню або реагують з ендogenousним оксидом азоту з утворенням пероксинітриду. Оскільки зазначені АФК знешкоджуються за допомогою глутатіону, зниження його концентрації стає передумовою для накопичення токсичних метаболітів ацетамінофену [72].

Таким чином, ймовірно, за умов токсичного ураження ацетамінофеном висока активність MAO може стати однією із причин розвитку окисного стресу. При цьому, за умов токсичного ураження, ймовірно, буде посилюватися нестача глутамату – необхідного метаболіту для утворення глутатіону. Синтез даного антиоксиданта відбувається у два етапи та потребує енергії АТФ. Перший етап каталізується глутамат-цистеїновою лігазою та включає кон'югацію цистеїну з глутаматом. Другий етап каталізується GSH-синтазою, яка приєднує гліцин до  $\gamma$ -глутамілцистеїну з

утворенням  $\gamma$ -глутамілцистеїнілгліцину або GSH. За фізіологічних умов активність першого ензиму регулюється конкурентним неалостеричним інгібуванням за принципом зворотнього зв'язку та доступністю цистеїну. При цьому, основними джерелами цистеїну для синтезу глутатіону виступають харчові протеїни та перетворення метіоніну у печінці шляхом транссульфурації, активність якого порушується за умов цирозу [73].

Проте, значення глутатіону не обмежується синтезом амінокислот, оскільки від бере важливу участь в антиоксидантному захисті клітин. N-ацетил-*p*-бензохінонімін – токсичний метаболіт ацетамінофену, що здатен зв'язуватися із сульфгідрильними групами цистеїну (APAP-CYS), пошкоджуючи таким чином білки, зокрема ензими мітохондрій. За нормальних концентрацій глутатіону у гепатоцитах перетворення ацетамінофену не викликають ушкоджень печінки, проте, за умов передозування виникає APAP-індукована токсичність. При цьому, відбувається індукція некрозу клітин, що зумовлена надлишком APAP-CYS та виснаженням пулу доступного глутатіону [74].

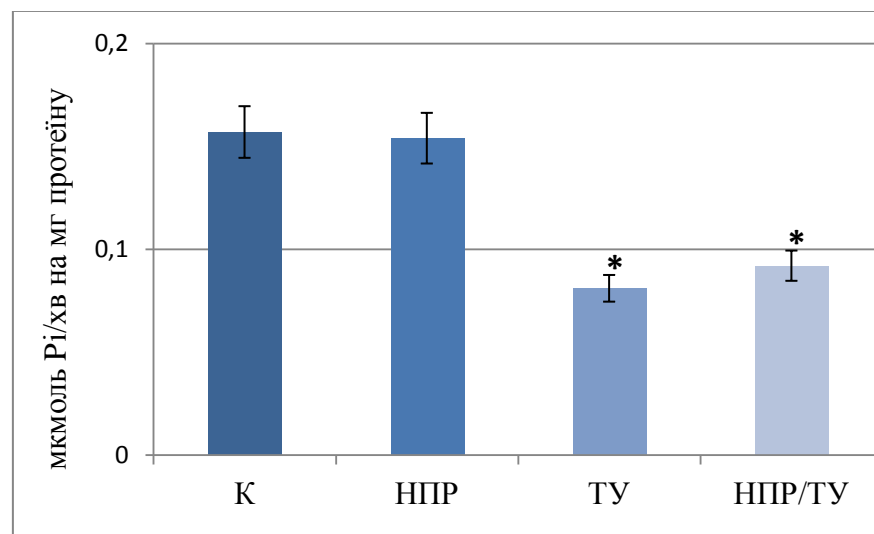
Отже, результати проведених досліджень показали, що за умов токсичного ураження ацетамінофеном підвищення вмісту аміаку у сироватці крові не пов'язане з його посиленням утворенням. На наступному етапі наших досліджень нами було встановлено активність карбамоїлфосфатсинтетази 1, ензиму циклу сечовини, основного шляху знешкодження аміаку.

На сьогодні відомо про два типи ензимів, що визначають активність орнітинового циклу: одні регулюють швидкість циклу, інші – беруть участь у синтезі його проміжних метаболітів [75].

Першим та лімітуючим ензимом циклу сечовини є карбамоїлфосфатсинтетаза 1, що каталізує утворення карбамоїлфосфату з аміаку, бікарбонату та двох молекул АТФ. Визначаючи потік метаболітів через весь цикл вона функціонує для підтримки нормального рівня аміаку в організмі. Дефіцит даного білка призводить до важкої гіперамоніємії [75, 76].

Результати проведених досліджень показали збереження карбамоїлфосфатсинтетазної активності у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов споживання низькопротеїнового раціону. При цьому спостерігається достовірне зменшення активності ензиму у тварин, яким моделювали токсичне ураження за умов різних режимів білкового харчування (рис. 3.8).

Отже, ймовірно, встановлені нами результати вказують на порушення функціонування циклу сечовини за умов токсичного ураження ацетамінофеном за різних режимів білкового харчування.



**Рис. 3.8.** Карбамоїлфосфатсинтетазна активність у мітохондріальній фракції печінки щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

У печінці детоксикацію аміаку перш за все пов'язують з двома основними процесами: синтезом сечовини та глутаміну. На сьогодні відомо, що утворення та гідроліз глутаміну у печінці мають різну локалізацію. Так, перипортальні гепатоцити експресують глутаміназу, яка забезпечує дезамінування та утворення аміаку. Тут же відбувається його зв'язування у складі карбамоїлфосфату, що залучається у цикл сечовини. Натомість незначна частина аміаку використовується глутамінсинтетазою для продукції глутаміну, що відбувається виключно у перицентральных гепатоцитах [6, 43].

Карбамоїлфосфатсинтетаза – ключовий ензим орнітинового циклу, що володіє низькою спорідненістю до аміаку, проте кількісно переважає у гепатоцитах. При цьому, лише 7-10% центрально розташованих гепатоцитів експресують глутамінсинтетазу, яка реалізує альтернативний шлях знешкодження, маючи високу спорідненість до цього метаболіту. Таким чином, обидва ензими завдяки різній локалізації та спорідненості до субстрату забезпечують максимальне зв'язування та знешкодження аміаку [6].

Відомим алостеричним активатором карбамоїлфосфатсинтетази є *N*-ацетил-*L*-глутамат, концентрація якого зростає у відповідь на посилення катаболізму амінокислот. Ефектор, зв'язуючись із *C*-кінцевим доменом ензиму, викликає тривалі конформаційні зміни у його структурі, що своєю чергою дозволяє здійснити фосфорилування субстрату. Крім того, наявність даного регулятора підвищує спорідненість фермента до таких його активаторів як калій та магній [75, 77]. Утворення *N*-ацетил-*L*-глутамату здійснюється трансферазою *N*-ацетилглутаматсинтазою, яка локалізована у матриксі мітохондрій та каталізує реакцію між ацетил-КоА та глутаматом [78, 79].

Відомим є факт, що у ссавців кількість ензимів циклу сечовини може коливатися у відповідь на тривалі зміни доступності субстрату, таким чином дієта з високим вмістом білка та катаболічні стани призводять до збільшення ємності циклу, а низький вміст білка у раціоні – зменшення. Зазначені зміни зумовлені, зокрема, гормональними сигналами (глюкокортикоїди та глюкагон), які стимулюють експресію відповідних ензимів [75].

На сьогодні існують дані, які підтверджують важливість білкового обміну для здійснення таких ключових функцій печінки як синтезу альбумінів, протромбінів та детоксикації аміаку. Зокрема, основною причиною порушення синтезу альбумінів вважається дефіцит незамінних амінокислот із розгалуженим ланцюгом.

При порушенні детоксикації аміаку у печінці, зокрема, через зниження кількості гепатоцитів, імовірно, даний метаболіт спрямовується у скелетні м'язи. Тут амінокислоти із розгалуженим ланцюгом за участі амінотрансфераз використовуються для синтезу глутамату та відповідних кетокислот. Глутамат своєю чергою необхідний для утворення глутаміну шляхом зв'язування аміаку, таким чином, забезпечуючи знешкодження аміаку при пошкодженні тканини печінки [75].

Отже, результати проведених досліджень показали, що накопичення аміаку не пов'язане з його посиленням утворенням, а зумовлене порушенням знешкодження даного метаболіту за умов експерименту.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що достовірні зміни вмісту залишкового азоту у сироватці крові спостерігаються лише у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном, які перебували на повноцінному харчуванні. Водночас у тварин цієї дослідної групи встановлено підвищення вмісту глутаміну, що пояснює підвищення вмісту залишкового азоту. При цьому у щурів з токсичним ураженням на тлі аліментарного дефіциту протеїну значення показника залишкового азоту порівняно з контролем достовірно не змінюється, проте значно підвищується вміст глутаміну. Отримані результати свідчать про перерозподіл між окремими компонентами залишкового азоту у групі НПР/ТУ за умов збереження його загального вмісту.

2. Визначення вмісту нітрогену аміаку показало значне зниження його рівня у тварин групи НПР, що, ймовірно, пов'язано зі нестачею азоту через споживання низькопротеїнового раціону. При цьому зростання нітрогену аміаку у сироватці крові спостерігається у групах щурів, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну, що свідчить про формування стану гіперамоніємії за досліджуваних умов.

3. Встановлено, що за умов токсичного ураження ацетамінофеном підвищення вмісту аміаку у сироватці крові не пов'язане з його посиленням утворенням, оскільки у печінці не спостерігається підвищення активності основних ензимів утворення аміаку – глутамінази та глутаматдегідрогенази.

4. Результати проведених досліджень показали, що у групах ТУ та НПР/ТУ спостерігається зниження активності ключового ензиму знешкодження аміаку у печінці – карбамоїлфосфатсинтетази, що може стати причиною формування стану гіперамоніємії за досліджуваних умов.

Отже, визначення активностей ензимів метаболізму аміаку у щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну показало, що накопичення аміаку не пов'язане з його посиленням утворенням, а зумовлене порушенням знешкодження даного метаболіту за умов експерименту.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kanchanasurakit S., Arsu A., Siriplabpla W., Duangjai A., Saokaew S. Acetaminophen use and risk of renal impairment: A systematic review and meta-analysis. *Kidney Res Clin Pract.* 2020. Vol. 39, № 1. P. 81-92.
2. Cai X., Cai H., Wang J., Yang Q., Guan J., Deng J., Chen Z. Molecular pathogenesis of acetaminophen-induced liver injury and its treatment options. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2022. Vol. 23, № 4. P. 265-285.
3. Ali R., Nagalli S. Hyperammonemia. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557504/>.
4. Levitt D.G., Levitt M.D. A model of blood-ammonia homeostasis based on a quantitative analysis of nitrogen metabolism in the multiple organs involved in the production, catabolism, and excretion of ammonia in humans. *Clin Exp Gastroenterol.* 2018. Vol. 11. P. 193-215.
5. Plaitakis A., Kalef-Ezra E., Kotzamani D., Zaganas I., Spanaki C. The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology (Basel).* 2017. Vol. 6, № 1. P. 11.
6. Stern R.A., Mozdziak P.E. Differential ammonia metabolism and toxicity between avian and mammalian species, and effect of ammonia on skeletal muscle: A comparative review. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2019. Vol. 103. P. 774-785.
7. Ramachandran A., Jaeschke H. Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene Expr.* 2018. Vol. 18, № 1. P. 19-30.
8. Yoon E., Babar A., Choudhary M., Kutner M., Prysopoulos N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *J Clin Transl Hepatol.* 2016. Vol. 4, № 2. P. 131-42.
9. Li X., Lao R., Lei J., Chen Y., Zhou Q., Wang T., Tong Y. Natural Products for Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury: A Review. *Molecules.* 2023. Vol. 28, № 23. P. 7901.

10. Liao J., Lu Q., Li Z., Li J., Zhao Q., Li J. Acetaminophen-induced liver injury: Molecular mechanism and treatments from natural products. *Front Pharmacol.* 2023. Vol. 14. P. 1122632.
11. Geib T., Lento C., Wilson D.J., Sleno L. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Acetaminophen Covalent Binding to Glutathione S-Transferases. *Front. Chem.* 2019. Vol. 7. P. 558.
12. McGill M.R., Hinson J.A. The development and hepatotoxicity of acetaminophen: reviewing over a century of progress. *Drug Metab Rev.* 2020. Vol. 52, № 4. P. 472-500.
13. Miller M.G., Jollow D.J. Effect of L-ascorbic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity and covalent binding in hamsters. Evidence that in vitro covalent binding differs from that in vivo. *Drug Metab Dispos.* 1984. Vol. 12, № 3. P. 271-9.
14. Ramachandran A., Jaeschke H. A mitochondrial journey through acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2020. Vol. 140. P. 111282.
15. Ntamo Y., Ziqubu K., Chellan N., Nkambule B., Nyambuya M., Mazibuko-Mbeje S., Gabuza K., Marcheggiani F., Tiano L., Dlodla Ph. Drug-Induced Liver Injury: Clinical Evidence of N-Acetyl Cysteine Protective Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2021. Vol. 3320325. P. 12.
16. Ramachandran A., Jaeschke H. Acetaminophen hepatotoxicity: A mitochondrial perspective. *Adv Pharmacol.* 2019. Vol. 85. P. 195-219.
17. Weiner I.D., Mitch W.E., Sands J.M. Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015. Vol. 10, № 8. P. 1444-58.
18. Wu G. Dietary protein intake and human health. *Food Funct.* 2016. Vol. 3. P. 1251-65.
19. Fitzpatrick M.C., Kurpad A.V., Duggan C.P., Ghosh S., Maxwell D.G. Dietary intake of sulfur amino acids and risk of kwashiorkor malnutrition in eastern Democratic Republic of the Congo. *Am J Clin Nutr.* 2021. Vol. 114, № 3. P. 925-933.

20. Katayama K. Zinc and protein metabolism in chronic liver diseases. *Nutr Res.* 2020. Vol. 74. P. 1-9.
21. May T., Klatt K.C., Smith J., Castro E., Manary M., Caudill M.A., Jahoor F., Fiorotto M.L. Choline Supplementation Prevents a Hallmark Disturbance of Kwashiorkor in Weanling Mice Fed a Maize Vegetable Diet: Hepatic Steatosis of Undernutrition. *Nutrients.* 2018. Vol. 10, № 5. P. 653.
22. Koopman R., Walrand S., Beelen M., Gijzen A.P., Kies A.K., Boirie Y., Saris W.H., van Loon L.J. Dietary protein digestion and absorption rates and the subsequent postprandial muscle protein synthetic response do not differ between young and elderly men. *J Nutr.* 2009. Vol. 139, № 9. P. 1707-13.
23. Tapper E.B., Jiang Z.G., Patwardhan V.R. Refining the ammonia hypothesis: a physiology-driven approach to the treatment of hepatic encephalopathy. *Mayo Clin Proc.* 2015. Vol. 90, № 5. P. 646-58.
24. Yao Z.P., Li Y., Liu Y., Wang H.L. Relationship between the incidence of non-hepatic hyperammonemia and the prognosis of patients in the intensive care unit. *World J Gastroenterol.* 2020. Vol. 26, № 45. P. 7222-7231.
25. Deutsch-Link S., Moon A.M., Jiang Y., Barritt A.S. 4th, Tapper E.B. Serum Ammonia in Cirrhosis: Clinical Impact of Hyperammonemia, Utility of Testing, and National Testing Trends. *Clin Ther.* 2022. Vol. 44, № 3. P. e45-e57.
26. Levitt M.D., Levitt D.G. Use Of Quantitative Modelling To Elucidate The Roles Of The Liver, Gut, Kidney, And Muscle In Ammonia Homeostasis And How Lactulose And Rifaximin Alter This Homeostasis. *Int J Gen Med.* 2019. Vol. 12. P. 367-380.
27. Levitt D.G., Levitt M.D. A model of blood-ammonia homeostasis based on a quantitative analysis of nitrogen metabolism in the multiple organs involved in the production, catabolism, and excretion of ammonia in humans. *Clin Exp Gastroenterol.* 2018. Vol. 11. P. 193-215.
28. Delgado T.C., de Las Heras J., Martínez-Chantar M.L. Understanding gut-liver axis nitrogen metabolism in Fatty Liver Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022. Vol. 13. P. 1058101.

29. Weiner I.D., Verlander J.W. Emerging Features of Ammonia Metabolism and Transport in Acid-Base Balance. *Semin Nephrol.* 2019. Vol. 39. P. 394-405.
30. Adeva M. M., Adeva G., Adeva N., Donapetry C. Ammonium metabolism in humans. *Metabolism.* 2012. Vol. 61, № 11. P. 1495-1511.
31. Zeng Q., Sang Y.M. Glutamate dehydrogenase hyperinsulinism: mechanisms, diagnosis, and treatment. *Orphanet J Rare Dis.* 2023. Vol. 18, № 1. P. 21.
32. Режим доступа: <https://pharmaxchange.info/2013/08/metabolism-of-amino-acids-%E2%80%93-bimolecular-ping-pong-mechanism-of-transamination/role-of-glutamate-dehydrogenase/>
33. Dhiman P., Malik N., Khatkar A. Natural based piperine derivatives as potent monoamine oxidase inhibitors: an in silico ADMET analysis and molecular docking studies. *BMC Chem.* 2020. Vol. 14, № 1. P. 12.
34. Heger J., Hirschhäuser C., Bornbaum J., Sydykov A., Dempfle A., Schneider A., Braun T., Schlüter K.D., Schulz R. Cardiomyocytes-specific deletion of monoamine oxidase B reduces irreversible myocardial ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 2021. Vol. 165. P. 14-23.
35. Walker V. Ammonia metabolism and hyperammonemic disorders. *Adv Clin Chem.* 2014. Vol. 67. P. 73-150.
36. Deutsch-Link S., Moon A.M. The Ongoing Debate of Serum Ammonia Levels in Cirrhosis: the Good, the Bad, and the Ugly. *Am J Gastroenterol.* 2023. Vol. 118, № 1. P. 10-13.
37. Redolfi-Bristol D., Mangiameli A., Yamamoto K., Marin E., Zhu W., Mazda O., Riello P., Pezzotti G. Ammonia Toxicity and Associated Protein Oxidation: A Single-Cell Surface Enhanced Raman Spectroscopy Study. *Chem Res Toxicol.* 2024. Vol. 37, № 1. P. 117-125.
38. Holecek M. Evidence of a vicious cycle in glutamine synthesis and breakdown in pathogenesis of hepatic encephalopathy-therapeutic perspectives. *Metab Brain Dis.* 2014. Vol. 29, № 1. P. 9-17.

39. Режим доступа: [https://freegurumk.best/product\\_details/54744746.html](https://freegurumk.best/product_details/54744746.html)
40. Weiner I.D., Verlander J.W. Ammonia Transporters and Their Role in Acid-Base Balance. *Physiol Rev.* 2017. Vol. 97, № 2. P. 465-494.
41. Gao X., Fan L., Li H., Li J., Liu X., Sun R., Yu Z. Hepatic injury is associated with cell cycle arrest and apoptosis with alteration of cyclin A and D1 in ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. *Exp Ther Med.* 2016. Vol. 11, № 2. P. 427-434.
42. Miramontes E., Mozdziak P., Petite J.N., Kulus M., Wieczorkiewicz M., Kempisty B. Skeletal Muscle and the Effects of Ammonia Toxicity in Fish, Mammalian, and Avian Species: A Comparative Review Based on Molecular Research. *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, № 13. P. 4641.
43. Wierling C. Bridging the gap between metabolic liver processes and functional tissue structure by integrated spatiotemporal modeling applied to hepatic ammonia detoxification. *Hepatology.* 2014. Vol. 60. P. 1823-1825.
44. Taylor L., Curthoys N.P. Glutamine metabolism: Role in acid-base balance. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2004. Vol. 32. P. 291-304.
45. Mohiuddin S.S., Khattar D. Biochemistry, Ammonia. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541039/>
46. Lee H.W., Osis G., Handlogten M.E., Lamers W.H., Chaudhry F.A., Verlander J.W., Weiner I.D. Proximal tubule-specific glutamine synthetase deletion alters basal and acidosis-stimulated ammonia metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016. Vol. 310, № 11. P. F1229-42.
47. Harris A.N., Skankar M., Melanmed M., Batlle D. An Update on Kidney Ammonium Transport Along the Nephron. *Adv Kidney Dis Health.* 2023. Vol. 30, № 2. P. 189-196.
48. Lee H.W., Osis G., Handlogten M.E., Verlander J.W., Weiner I.D. Proximal tubule glutamine synthetase expression is necessary for the normal response to dietary protein restriction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017. Vol. 313, № 1. P. F116-F125.

49. Voloshchuk O.M., Kopylchuk G.P. Characteristics of water-salt balance in protein-deficiency rats with acetaminophen-induced toxic injury. *Fiziol. Zh.* 2019. Vol. 65, № 3. P. 28-33.
50. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993. Vol. 123, № 11. P. 1939-51.
51. Kopylchuk G. P., Ivanovich I. Y., Voloshchuk O. M. Peculiarities of ammonia metabolism in the liver of rats under the conditions of different nutrients content in a diet. *Ukr.Biochem.J.* 2020. Vol. 92, № 4. P. 70-76.
52. Kopylchuk G. P., Voloshchuk O. M., Pasailiuk M. V. Comparison of total amino acid compositions, total phenolic compounds, total flavonoid content,  $\beta$ -carotene content and hydroxyl radical scavenging activity in four wild edible mushrooms. *IJM - Italian Journal of Mycology.* 2023. Vol. 52. P. 112-125.
53. Kopylchuk G. P., Nykolaichuk I. M., Moskalyk G. G. The content of residual nitrogen in rats' blood plasma under the conditions of toxic damage on the background of alimentary protein deprivation. *Biological systems.* 2021. Vol. 13, № 1. P. 45-50.
54. Kopylchuk G. P., Ivanovich I. Y., Voloshchuk O. M. Peculiarities of ammonia metabolism in the liver of rats under the conditions of different nutrients content in a diet. *Ukr. Biochem. J.* 2020. Vol. 92, № 4. P. 70-76.
55. Kopylchuk G. P., Nykolaichuk I. M., Lylyk I. S. Indexes of citrulline metabolism in rat liver under the toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Ukr. Biochem. J.* 2020. Vol. 92, № 1. P. 113-119.
56. Pagliara AS, Goodman AD. Relation of renal cortical gluconeogenesis, glutamate content, and production of ammonia. *J Clin Invest.* 1970. Vol. 49, № 11. P. 1967-74.
57. Левченко В. І., Головаха В. І., Кондрахін І. П., Рубленко М. В., Сахнюк В. В., Цвіліховський М. І., Апуховська Л. І., Безух В. М., Вовкоткуб Н. В., Кібкало Д. В., Москаленко В. П., Розумнюк А. В., Слівінська Л. Г.,

Тишківський М. Я., Чуб О. В. Методи лабораторної клінічної діагностики хвороб тварин: навчальний посібник. Київ. 2010. 437 с.

58. Sousa B.G., Mebus-Antunes N.C., Fernandes-Siqueira L.O., Caruso M.B., Saraiva G.N., Carvalho C.F., Neves-Martins T.C., Galina A., Zingali R.B., Zeidler J.D., Da Poian A.T.. Dengue virus non-structural protein 3 inhibits mitochondrial respiration by impairing complex I function. *mSphere*. 2024. Vol. 9, № 7. P. e0040624.

59. Brosnan J.T. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr*. 2003. Vol. 133. 6, № 1. P. 2068S-2072S.

60. Cruzat V., Macedo Rogero M., Noel Keane K., Curi R., Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*. 2018. Vol. 10, № 11. P. 1564.

61. Fialová L., Vejražka. Non-protein nitrogen compounds. Режим доступу: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/4773/non-protein-nitrogen2021-theory.pdf>.

62. Chapman B., Sinclair M., Gow P.J., Testro A.G. Malnutrition in cirrhosis: More food for thought. *World J Hepatol*. 2020. Vol. 12, № 11. P. 883-896.

63. Barmore W., Azad F., Stone W.L. Physiology, Urea Cycle. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513323/>.

64. Hong R., Li X. Discovery of monoamine oxidase inhibitors by medicinal chemistry approaches. *Medchemcomm*. 2018. Vol. 10, № 1. P. 10-25.

65. Moedas M.F., Simões R.J.M., Silva M.F.B. Mitochondrial targets in hyperammonemia: Addressing urea cycle function to improve drug therapies. *Biochem Pharmacol*. 2024. Vol. 222. P. 116034.

66. Karim Z., Szutkowska M., Vernimmen C., Bichara M. Renal handling of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ : recent concepts. *Nephron Physiol*. 2005. Vol. 101, № 4. P. 77-81.

67. Zimmermann M., Reichert A.S. Rapid metabolic and bioenergetic adaptations of astrocytes under hyperammonemia - a novel perspective on hepatic encephalopathy. *Biol Chem*. 2021. Vol. 402, № 9. P. 1103-1113.

68. Cynober L. Metabolism of Dietary Glutamate in Adults. *Ann Nutr Metab.* 2018. Vol. 73, № 5. P. 5-14.
69. Dasarathy S., Hatzoglou M. Hyperammonemia and proteostasis in cirrhosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2018. Vol. 21, № 1. P. 30-36.
70. Luczkowska K., Zhou Y., Ramos-Lobo A.M., Brun T., Maechler P. Dietary protein load affects the energy and nitrogen balance requiring liver glutamate dehydrogenase to maintain physical activity. *J Biol Chem.* 2024. Vol. 300, № 7. P. 107473.
71. Pfäfflin A., Müssig K., Schleicher E. Interference of paracetamol (acetaminophen) with a commercially available high-performance liquid chromatography analysis of serotonin leading to falsely low serotonin levels. *Ann Clin Biochem.* 2009. Vol. 46, № 2. P. 146-8.
72. Yan M., Huo Y., Yin S., Hu H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biol.* 2018. Vol. 17. P. 274-283.
73. Lu S.C. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013. Vol. 1830, № 5. P. 3143-53.
74. Jaeschke H., Ramachandran A. Acetaminophen Hepatotoxicity: Paradigm for Understanding Mechanisms of Drug-Induced Liver Injury. *Annu Rev Pathol.* 2024. Vol. 19. P. 453-478.
75. Watford M. The urea cycle: Teaching intermediary metabolism in a physiological setting. *IUBMB journals.* 2006. Vol. 31, № 5. P. 289-297.
76. Khoja S., Nitzahn M., Hermann K., Truong B., Borzone R., Willis B., Rudd M., Palmer D.J., Ng P., Brunetti-Pierri N., Lipshutz G.S. Conditional disruption of hepatic carbamoyl phosphate synthetase 1 in mice results in hyperammonemia without orotic aciduria and can be corrected by liver-directed gene therapy. *Mol Genet Metab.* 2018. Vol. 124, № 4. P. 243-253.
77. de Cima S., Polo L.M., Díez-Fernández C., Martínez A.I., Cervera J., Fita I., Rubio V. Structure of human carbamoyl phosphate synthetase: deciphering the on/off switch of human ureagenesis. *Sci Rep.* 2015. Vol. 23, № 5. P. 16950.



78. Meijer A.J., Lof C., Ramos I.C., Verhoeven A.J. Control of ureogenesis. *Eur J Biochem.* 1985. Vol. 148, № 1. P. 189-96.

79. Shi D., Allewell N.M., Tuchman M. The N-Acetylglutamate Synthase Family: Structures, Function and Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2015. Vol. 16, № 6. P. 13004-22.

## ДОДАТКИ

### Охорона праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях

#### Загальні вимоги

1. Дана інструкція є обов'язковою при виконанні всіх видів робіт у навчальних на науково-навчальній лабораторіях (далі – лабораторіях) кафедри біохімії та біотехнології.

2. Відповідальним за організацію роботи в лабораторіях у відповідності з нормами і правилами техніки безпеки, охорони праці і протипожежної безпеки є завідувач лабораторіями і викладач, який проводить лабораторні роботи.

3. Робота у біохімічній лабораторії пов'язана з використанням шкідливих горючих (далі ГР), пожежо-небезпечних, легкозаймистих (далі ЛЗР), токсичних речовин у газоподібному, рідкому або твердому стані. При виконанні лабораторних робіт використовуються електронагрівальні та вимірювальні прилади. У мікробіологічній лабораторії робота проводиться з використанням культур мікроорганізмів, що вимагає умов дотримання стерильності.

4. До роботи в лабораторії допускаються студенти, які пройшли вступний первинний інструктаж та згідно з навчальним планом мають лабораторні заняття чи виконують заплановану науково-дослідну роботу.

5. До роботи в біохімічній лабораторії не допускаються працівники з поганим самопочуттям, у хворобливому стані, при медичних протипоказаннях.

6. Будь-які роботи потрібно виконувати точно та акуратно, не допускаючи поспішності та безпорядку. Всі необхідні розрахунки треба робити наперед і тільки в робочих журналах. Робити записи і розрахунки на чернетках або випадкових папірцях не дозволяється.

7. На робочому місці повинні знаходитися тільки необхідні для виконання конкретної роботи реактиви, прилади та обладнання, зошит для записів спостережень та інструкція до лабораторної роботи. Все, що могло би

завадити своєчасній ліквідації наслідків можливої аварії, повинно бути забрано. Мінімальний запас посуду необхідний, але він повинен зберігатись окремо. Якщо посуд не має постійного місця, зберігається неакуратно, він обов'язково розіб'ється.

8. Дослідні роботи, результат яких неможливо передбачити наперед, не слід проводити з великими кількостями речовин. Проте, навіть якщо дослідні проби з малими кількостями проходять добре, то при переході до великих наробок треба дотримуватись обережності.

9. Основними небезпечними й шкідливими факторами при роботі в лабораторіях є:

- небезпека опіку хімікатами через порушення правил техніки безпеки при проведенні дослідів;

- загазованість приміщення токсичними, пожежо- і вибухонебезпечними речовинами виникає при роботі з леткими й газоподібними речовинами поза витяжною шафою, при раптовому руйнуванні лабораторного обладнання, при проливі летких рідин;

- небезпека ураження електричним струмом може бути у випадку відсутності або неполадках заземлення, неполадок роз'ємів і пускових пристроїв, при порушенні правил користування електрообладнанням і приладами;

- небезпека пораненням склом зумовлена застосуванням скляного посуду, скляних приладів і устаткування у випадку порушення цілісності цих виробів, при використанні частково зруйнованих або надколотих скляних виробів, при неправильному їх застосуванні або використанні не за призначенням;

10. Кожен працівник повинен мати спецодяг – бавовняний халат (але не синтетичний), волосся повинне бути зібране в пучок або мати хустинку на голові. При потребі необхідно використовувати захисну маску. Необхідно враховувати високу сорбційну здатність текстильних матеріалів по відношенню до отруйних газів і речовин. Вони виділяються із пор

забрудненого одягу і можуть шкідливо діяти на організм. Тому спецодяг треба регулярно прати. У випадку попадання будь-яких хімічних речовин на одяг, його треба негайно замінити. Не можна зберігати разом робочі халати та особистий одяг. Працювати, навіть, знаходитися в лабораторії без спецодягу та головного убору заборонено.

11. У лабораторіях суворо ЗАБОРОНЕНО:

- працювати при несправній вентиляції;
- виконувати будь-які роботи, не пов'язані безпосередньо з виконанням завдань;
- курити, зберігати та споживати їжу;
- працювати без спецодягу;
- шуміти, голосно розмовляти, бігати, робити різкі рухи;
- мобільні телефони повинні бути вимкнені;
- зберігати особистий одяг, сумки;
- працювати в лабораторії одному;
- залишати без нагляду працюючі установки, нагрівальні прилади, відкрите полум'я. Якщо треба ненадовго відлучитись від працюючої установки, потрібно **ОБОВ'ЯЗКОВО** доручити нагляд за нею іншому досвідченому працівнику.

### **Вимоги безпеки перед початком роботи**

1. Заходити до лабораторії і приступати до роботи можна тільки з дозволу викладача або завідувача лабораторіями і проходження вступного, первинного чи цільового інструктажу з охорони праці з відміткою у журналі.

2. Не дозволяється самостійно включати електроприлади.

3. Перед початком роботи потрібно включити витяжну вентиляцію. Проводити роботи за відсутністю примусової вентиляції категорично забороняється.

4. Перед початком робіт необхідно одягнути спецодяг, а при необхідності – додаткові захисні засоби (гумові рукавиці, респіратори, окуляри тощо).

### **Вимоги безпеки під час виконання роботи**

1. Виконавець робіт повинен знати про небезпечні фактори, які виникають при роботі в біохімічній лабораторії.

2. Студенти зобов'язані виконувати тільки ті дослідження, які вказані в інструкції до певної лабораторної роботи чи до певного експерименту.

3. Всі роботи, пов'язані з виділенням шкідливих речовин або газів повинні проводитися під витяжною шафою.

### **Основні правила з користування центрифугою**

Користувач повинен уважно прочитати керівництво користувача перед початком роботи на центрифугі!

1. Перед початком роботи користувач повинен переконатися, що кабель живлення є цілим та не пошкодженим.

2. Перевірити ротор центрифуги на наявність сторонніх предметів чи забруднення. Якщо такі присутні, видалити їх та очистити роторну камеру та ротор від забруднень.

3. Використовувати тільки ті типи пробірок, які вказані в інструкції користувача та дозволені уповноваженим регіональним представником, або виробником центрифуги.

4. Не можна використовувати скляні пробірки з видимими дефектами та пошкодженнями.

5. Пробірки (окрім пластикових пробірок з кришкою на 15 мл) необхідно встановлювати в спеціальні захисні.

6. Перед початком роботи користувач повинен перевіряти стан утримувача пробірок, їх наявність в роторі та їх чистоту. При необхідності адаптери повинні бути очищені та знезаражені дезінфікуючим розчином

згідно чинного регламенту медичного закладу. Якщо адаптер має пошкодження, користувач повинен його замінити на новий.

7. Пробірки повинні бути встановлені симетрично, одна навпроти одної, для запобігання дисбалансу ротору під час роботи центрифуги. Дисбаланс ротору призведе до ушкодження центрифуги, ротору та роторної камери, або навіть ушкодження персоналу, який знаходиться поряд.

8. Якщо користувач використовує одну пробірку або декілька та для балансу ротора йому не вистачає кількості пробірок з дослідним матеріалом, він повинен встановити додаткову пробірку з дистильованою водою або речовиною, яка буде однакової ваги з іншими пробірками.

9. Якщо пробірка має малі розміри та не досягає дна утримувача необхідно використовувати спеціальні адаптери, які встановлюються в середину утримувача пробірок та виконують функцію зменшення довжини утримувача для пробірки, що дає змогу пробірці надійно зафіксуватися.

10. Центрифуга працює тільки із закритою кришкою. Не можна відкривати кришку під час роботи, переміщувати її.

11. Після закінчення встановленого часу центрифугування потрібно дочекатися повної зупинки ротору центрифуги та відкриття її кришки, тільки потім виймати пробірки з дослідним матеріалом.

12. Після закінчення роботи потрібно уважно оглянути центрифугу на наявність зовнішніх та внутрішніх пошкоджень та забруднень.

13. Якщо Ви виявили забруднення, потрібно відключити центрифугу від живлення, видалити забруднення та продезінфікувати.

### **Порядок дій при виявленні проблем під час роботи на центрифугі.**

Якщо користувач виявив ушкодження ротора або роторної камери, він повинен негайно звернутися до регіонального представника виробника та повідомити про випадок, детально описати ситуацію та пошкодження центрифуги.