

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

**БИОМАРКЕРИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ НИРОК У ЩУРІВ  
РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ДИКВАТ-ІНДУКОВАНОГО УРАЖЕННЯ**

**Дипломна робота  
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)**

**Виконала:**

студентка 4 курсу 400 А група

**Пузич Марія Миколаївна**

**Керівник:**

кандидат біологічних наук, асистент

**Николайчук І.М.**

До захисту допущено  
на засіданні кафедри  
протокол № \_\_\_\_\_ від \_\_\_\_\_ 2025 р.  
Зав.кафедрою \_\_\_\_\_ доцент Волощук О.М

**Чернівці - 2025**

## АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню біомаркерів функціонального стану нирок – вмісту сечовини та креатиніну в сироватці крові, рівня мікроальбуміну в сечі – у щурів різного віку за умов дикват-індукованого токсичного ураження.

Встановлено, що за умов токсичного ураження дикватом в сироватці крові щурів різновікових груп спостерігається зростання рівня сечовини та креатиніну з найвищими значеннями у тварин 360-денного (зрілого) віку, що свідчить про вікове зниження функціональних резервів нирок.

Водночас за токсичної дії промислового ксенобіотика диквату в сечі різновікових щурів спостерігається поява мікроальбуміну – з найвищими значеннями у тварин підліткового (60 днів) та зрілого (360 днів) віку, що можна розглядати маркером раннього токсичного ураження клубочкового апарату нирок.

**Ключові слова:** сечовина, креатинін, мікроальбумін, токсичне ураження, дикват, нирки.

## ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to the study of biomarkers of renal functional status – namely, the levels of urea and creatinine in blood serum, and microalbumin in urine – in rats of different ages under conditions of diquat-induced toxic injury.

It was found that under diquat toxicity, rats of various age groups demonstrated increased levels of urea and creatinine in blood serum, with the highest values observed in 360-day-old (mature) animals, indicating an age-related decline in renal functional reserves.

At the same time, the exposure to the industrial xenobiotic diquat led to the appearance of microalbumin in the urine of rats of different ages, with the highest levels detected in adolescent (60-day-old) and mature (360-day-old) animals, which may be considered an early marker of toxic damage to the glomerular apparatus of the kidneys.

***Key words:*** urea, creatinine, microalbumin, toxic injury, diquat, kidneys.

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

\_\_\_\_\_ М.М. Пузич  
(підпис)

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП .....</b>	<b>5</b>
<b>РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>7</b>
1.1. Метаболізм диквату в організмі.....	7
1.2. Особливості всмоктування диквату.....	8
1.3. Клініко-біохімічні показники функціонального стану нирок.....	9
1.3.1. Креатинін та його біологічна роль.....	10
1.3.2. Сечовина та її біологічне значення.....	12
1.4. Основні механізми ураження нирок під впливом диквату.....	13
<b>РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>15</b>
2.1. Об'єкти та методи досліджень.....	15
2.2. Отримання сироватки крові.....	15
2.3. Визначення концентрації сечовини в сироватці крові.....	16
2.4. Визначення вмісту креатиніну у сироватці крові.....	17
2.5. Визначення вмісту мікроальбуміну в сечі.....	19
2.6. Статистична обробка результатів.....	19
<b>РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....</b>	<b>20</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>32</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>33</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>38</b>

## ВСТУП

Сучасне сільське господарство базується на широкому застосуванні хімічних засобів захисту рослин, зокрема гербіцидів, що дозволяє підвищити врожайність та ефективність аграрного виробництва. Водночас активне використання пестицидів спричиняє зростання ризику токсичного впливу на довкілля, тварин та людину. Одним із таких хімічних агентів є дикват – біпіридиловий гербіцид контактної дії, який після заборони параквату набув ще більшого поширення.

Дикват характеризується вираженим токсичним впливом, що переважно реалізується через механізми оксидативного стресу. Його висока розчинність у воді, полярність та катіонний характер зумовлюють значну біодоступність і швидкий розподіл у тканинах, зокрема нирках, які є основним органом-мішенню. Потрапляючи в організм, дикват викликає пошкодження проксимальних канальців нирок, що спричиняє розвиток гострої ниркової недостатності (ГНН), а в тяжких випадках – поліорганної дисфункції та смерті.

З огляду на надзвичайну чутливість ниркової тканини до дії ксенобіотиків, особливо в умовах інтенсивного метаболізму, оцінка функціонального стану нирок є важливим завданням експериментальної токсикології. Біохімічними маркерами, що дозволяють виявити порушення ниркової функції, є рівні сечовини та креатиніну в сироватці крові. Ці показники відображають стан білкового та м'язового метаболізму, а їх зміни корелюють зі ступенем порушення гломерулярної фільтрації.

Відомо, що функціональна активність організму, зокрема діяльність нирок, має вікову залежність. У різні періоди онтогенезу реакція на токсичні речовини може суттєво відрізнятись, що зумовлено як морфофункціональними особливостями, так і метаболічною активністю організму. Тому дослідження вікових відмінностей у відповіді на токсичне ураження набуває особливого значення для розуміння адаптаційного потенціалу та резистентності біологічних систем до дії шкідливих чинників.

У цьому контексті особливу актуальність має дослідження змін біохімічних показників функціонального стану нирок у щурів різного віку за умов дикват-індукованого ураження.

Мета роботи – дослідження біомаркерів функціонального стану нирок у різновікових щурів за умов токсичного ураження дикватом.

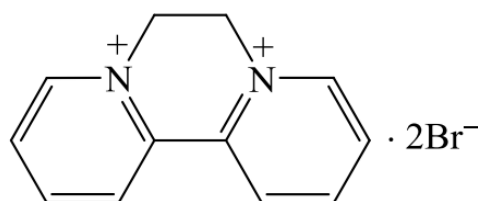
Для досягнення мети за даних експериментальних умов були поставлені наступні завдання:

- ✓ дослідити вміст сечовини та креатиніну в сироватці крові різновікових щурів;
- ✓ оцінити рівень мікроальбуміну в сечі різновікових щурів.

## РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Метаболізм диквату в організмі

Сучасне сільське господарство неможливо уявити без застосування хімічних засобів захисту рослин, серед яких важливе місце займають гербіциди. Одним із широко використовуваних контактних гербіцидів є дикват. Дикват – це потужний гербіцид широкого спектру дії, відомий своєю здатністю викликати серйозні та потенційно смертельні пошкодження в багатьох системах органів [1].



Структурна формула диквату

Дикват – це кристалічна сполука світло-жовтого кольору, добре розчинна у воді та спирті. Має виражену шкірно-резорбтивну токсичність, викликає подразнення шкіри та слизових оболонок верхніх дихальних шляхів. З організму виводиться переважно з фекаліями – до 90–97 % упродовж 48 годин. Хоча токсичність диквату в 5–6 разів нижча, ніж у параквату, рівень летальності при пероральних отруєннях сягає 40–50 % [2].

Летальні дози для лабораторних тварин становлять: 80 мг/кг для мишей, 123 мг/кг для морських свинок і 282 мг/кг для щурів.

На ранній стадії отруєння дикват може спричинити гострий респіраторний дистрес-синдром, що призводить до розвитку поліорганної дисфункції, патогенез якої досі незрозумілий. На сьогодні не існує специфічного детоксикаційного препарату для лікування отруєння дикватом. Поширюється через кровотік в органи і тканини всього організму, та переважно метаболізується в нирках. Висока полярність і катіонний характер

диквату ускладнює процеси його екскреції. Тому нирки є основним органом-мішенню після отруєння дикватом [3].

Після припинення використання параквату дикват став переважним біпіридиловим гербіцидом. Випадки отруєння дикватом продовжують збільшуватися в останні роки, і переважним шляхом впливу є шлунково-кишковий тракт [4]. Нирки є основним органом виділення, а також основною мішенню і токсичні ефекти останнього в основному охоплюють ниркові каналці, що зрештою призводить до гострого ураження нирок. Частота даного патологічного стану в пацієнтів із отруєнням дикватом становить 73,3%, що значно вище порівняно з частотою, спричиненою паракватом або іншими пестицидами [5].

Дисфункція ниркових каналців є початковим проявом токсичності диквату. Прогноз пацієнтів з отруєнням дикватом тісно пов'язаний з гострою нирковою недостатністю, який зазвичай є оборотним на ранній стадії. Однак, враховуючи короткотривалість лікування, частота кінцевих явищ (смерть або уремія) перевищує 30%. Тому раннє виявлення та профілактика гострої ниркової недостатності мають вирішальне значення у випадках отруєння дикватом. Смерть настає на 10 – 15 добу після отруєння дикватом [6].

## **1.2. Особливості всмоктування диквату**

Дикват може проникати в організм різними шляхами: перорально, інгаляційно та через шкіру. В експериментальних моделях основним шляхом надходження є шлунково-кишковий тракт. За даними токсикологічних досліджень, поглинання диквату через слизові оболонки досягає приблизно 10–20% від введеної дози. Після потрапляння в травну систему дикват частково руйнується, але більшість всмоктується і швидко потрапляє у системний кровотік. Через високу гідрофільність дикват практично не зв'язується з білками плазми крові, що забезпечує його вільну циркуляцію в організмі. Виявлено, що дикват здатний проникати у більшість органів, але

особливо активно він накопичується в нирках, де виявляється в концентраціях, значно вищих за плазмові [7].

Незважаючи на клінічні зусилля щодо пом'якшення його впливу шляхом введення антиоксидантних агентів, вони часто виявляються неефективними в управлінні фатальними наслідками впливу диквату. Ця неефективність може бути пов'язана зі швидкою активацією каскадів сигнальних шляхів, що запускаються надмірним мітохондріальним окислювальним стресом, що зрештою призводить до загибелі резидентних клітин в ураженій тканині. Крім того, точні молекулярні механізми, що лежать в основі клітинної смерті, індукованої дикватом, залишаються загадкою, яку ще належить розшифрувати [8].

### **1.3. Клініко-біохімічні показники функціонального стану нирок**

Головною функцією нирок є виведення токсичних та чужорідних речовин, а також їх надлишкових концентрацій із внутрішнього середовища організму людини і тварин. У сечі можуть накопичуватись токсичні сполуки та продукти їх біотрансформації. Через процес зворотної реабсорбції ксенобіотиків у ниркових каналцях нирки стають особливо вразливими до дії токсикантів. Унаслідок цього можливе пошкодження клітинної структури ниркової тканини під впливом токсичних агентів. [9].

Для визначення функції нирок найчастіше використовуються показники – креатинін та сечовина. Креатинін та сечовина в сироватці крові – це низькомолекулярні метаболіти азотовмісних речовин в організмі людини, які є репрезентативними показниками функції нирок [10].

Сечовина та креатинін в сироватці крові є простим і широко використовуваним показником для оцінки функції нирок у клініці. Сечовина утворюється в результаті метаболізму білка та амінокислот в організмі та виводиться нирками з сечею. Сечовина відображає фізіологічні реакції споживання та метаболізму білка людиною, функцію печінки та нирок [11].

Креатинін сироватки є продуктом м'язового метаболізму, його значення пов'язане з концентрацією креатиніну в м'язах. Таким чином, комбінація сечовини та креатиніну може відображати м'язовий та білковий метаболізм.

Сечовина часто аналізується разом із креатиніном для розрахунку співвідношення азоту сечовини до креатиніну в крові – важливого індикатора, який широко застосовується в клінічній практиці для оцінки функціонального стану нирок [12].

Гостра ниркова недостатність (ГНН) — це стрімке, різко виражене порушення ниркових функцій, яке може виникати внаслідок різноманітних причин: травм, інфекцій, дії токсичних речовин, сечокам'яної хвороби, артеріальної гіпертензії тощо.

На сьогоднішній день діагностика ГНН здебільшого базується на підвищенні рівнів креатиніну та сечовини в крові у поєднанні зі зниженням діурезу. Проте варто зазначити, що концентрації цих метаболітів у сироватці значно зростають лише тоді, коли функціональні можливості нирок знижуються приблизно на 50%. До того ж об'єм сечі, як показник, є варіативним і залежить від низки факторів, таких як прийом діуретиків та загальний об'єм циркулюючої крові [13].

### **1.3.1. Креатинін та його біологічна роль**

Креатинін (1-метилглікоціамідин) є кінцевим продуктом азотистого обміну у всіх хребетних, зокрема й у людини. В організмі він утворюється з креатину внаслідок метаболічних процесів, які залучають амінокислоти аргінін, гліцин і метіонін. Синтез креатину відбувається у два етапи: спочатку під дією ферменту гліцинамідинотрансферази в нирках і підшлунковій залозі аргінін передає амідну групу гліцину, внаслідок чого утворюється гуанідиноцтова кислота. Далі в печінці та підшлунковій залозі відбувається її метилювання за участю S-аденозилметіоніну під дією ферменту гуанідинацетатметилтрансферази [14].

Після синтезу креатин транспортується з током крові до інших органів, де бере участь у забезпеченні клітин енергією. У скелетних м'язах та головному мозку креатин у зворотній реакції з АТФ утворює креатинфосфат – високоенергетичну сполуку, що виконує функцію енергетичного резерву. Цей процес каталізується ферментом креатинкіназою (креатинфосфокіназою), яка представлена кількома ізоформами залежно від типу тканини. Креатинфосфат необхідний для м'язового скорочення, активного транспорту іонів у нейронах та інших енергозалежних процесів.

Приблизно 2% загального об'єму креатину щодня спонтанно, без участі ферментів, перетворюється на креатинін – малореактивну сполуку, яка виводиться із організму із сечею. Через стабільний рівень утворення креатиніну та його повне виведення нирками, він є надійним індикатором функціонального стану нирок [15].

Креатинін належить до безпорогових речовин, які виводяться із сечею, а його рівень у сироватці крові та сечі значною мірою залежить від м'язової маси організму та функціонального стану нирок. Підвищення концентрації креатиніну, як правило, свідчить про зниження видільної здатності ниркових клубочків.

Сироватковий рівень креатиніну широко застосовується в клінічній практиці для непрямой оцінки швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) та загальної функції нирок. Водночас слід враховувати, що на цей показник можуть впливати такі фізіологічні фактори, як вік, стать та маса тіла. Зростання вмісту креатиніну в крові зазвичай відбувається вже на пізніх етапах ниркової дисфункції — коли втрачено щонайменше 50% функціонуючих нефронів. Тому підвищений рівень креатиніну відображає переважно вже наявне, ретроспективне пошкодження ниркової тканини.

Основним джерелом креатиніну в сироватці є розпад креатину та фосфокреатину, що відбувається переважно в м'язовій тканині. Добова продукція креатиніну становить приблизно 20 мг на кілограм маси тіла й

прямо корелює з об'ємом м'язової маси. З віком, унаслідок зменшення м'язової маси, синтез креатиніну поступово знижується. За нормальних умов, основна частина креатиніну виводиться шляхом клубочкової фільтрації, хоча близько 15% додатково секретується каналцями нефронів [16].

### **1.3.2. Сечовина та її біологічне значення**

Сечовина (карбамід) – це діамід вугільної (карбонатної) кислоти, що являє собою безбарвну кристалічну речовину. Вона добре розчиняється у воді, спиртах, рідкому аміаку та сірчаному ангідриді, слабо – в етері, і практично не розчиняється в хлороформі.

У біологічному контексті сечовина є одним із основних кінцевих продуктів метаболізму білків, що утворюється в печінці в результаті перетворення аміаку під час циклу орнітину (сечовинного циклу). Її екскреція відбувається переважно нирками шляхом клубочкової фільтрації. Частина сечовини реабсорбується епітеліальними клітинами каналців, а також частково секретується тубулярним епітелієм.

Концентрація сечовини в крові визначається балансом між процесами її утворення в печінці та виведення через нирки. При патологічних станах цей баланс може порушуватись, що призводить до зміни рівня сечовини в крові. Крім того, виведення сечовини значною мірою залежить від білкового складу раціону: при підвищеному вмісті білка в їжі концентрація сечовини зростає.

Сечовина є основним компонентом азотистих продуктів обміну, які екскретуються з організму – близько 90% загального азоту видаляється саме у вигляді сечовини. У дітей раннього віку, а також у вагітних жінок, спостерігається незначне зниження концентрації сечовини, що пов'язано з активним білковим синтезом.

Оцінка рівня сечовини у біологічних рідинах використовується як один із маркерів для моніторингу процесів анаболізму та катаболізму, а також функціонального стану нирок [17].

Рівень сечовини у крові та сечі відображає стан нирок і печінки, а також загальне здоров'я метаболізму. Аналіз сечовини дозволяє оцінити функціонування нирок і виявити можливі порушення, такі як ниркова недостатність або порушення обміну речовин.

Підвищення рівня сечовини в крові може сигналізувати про ряд серйозних порушень у функції нирок, оскільки цей показник дозволяє оцінити їх здатність фільтрувати та виводити продукти обміну азоту з організму. Основними причинами високого рівня сечовини можуть бути хронічна ниркова недостатність, обструкція сечовивідних шляхів, серцево-судинні захворювання, великий розпад білків через важкі інфекції або значні ушкодження тканин. Тривале підвищення концентрації сечовини в крові може мати токсичну дію на організм, викликаючи розвиток симптомів загальної інтоксикації, таких як слабкість, втрата апетиту, нудота. У тяжких випадках накопичення азотистих метаболітів у крові здатне спричинити розвиток уремичної коми. Такий стан потребує негайного медичного втручання для встановлення причини порушення та призначення відповідного лікування з метою відновлення функціонального стану нирок і запобігання подальшим ускладненням [18].

#### **1.4. Основні механізми ураження нирок під впливом диквату**

Під впливом диквату відбувається низка порушень функціонального стану нирок, що зумовлено сукупністю взаємопов'язаних патофізіологічних механізмів.

Дипіридилові гербіциди, зокрема дикват, характеризуються вираженою прооксидантною активністю, що й визначає механізм їх токсичної дії. Основу патогенезу становить надмірне утворення активних форм кисню, зокрема супероксидних радикалів, які ініціюють перекисне окиснення ліпідів клітинних і мітохондріальних мембран. Це призводить до порушення структурної цілісності клітинних бар'єрів, зниження енергетичного

потенціалу клітин, розвитку гіпоксії та, як наслідок, – функціональної недостатності життєво важливих органів.

Особливо чутливими до дії диквату є альвеолярні епітеліоцити – пневмоцити I та, зокрема, II типу, що обумовлено високою спорідненістю речовини до легень. Вже в перші 4–7 годин після надходження токсиканта в організм спостерігаються ранні деструктивні зміни, які супроводжуються енергетичним дефіцитом у клітинах.

Ураження нирок за умов експозиції диквату має характер гострого тубулярного некрозу, що морфологічно проявляється вакуолізацією клітин проксимальних звивистих каналців і розвитком вогнищевих некротичних змін. У клінічних випадках отруєння у людей спостерігається прогресуюча гостра ниркова недостатність, що супроводжується стрімким підвищенням рівня сироваткового креатиніну, який може сягати 700–800 мкмоль/л, що свідчить про істотне зниження клубочкової фільтрації та втрату функціонального резерву нирок [19].

Негативний прогноз при отруєнні дикватом пов'язаний, насамперед, із пероральним надходженням значних доз концентрату або розчинів із високою концентрацією гербіциду. До несприятливих прогностичних ознак належать підвищений вміст диквату в плазмі крові та сечі, а також ранній розвиток поліорганної недостатності, що вказує на системну дію токсиканта.

Надання медичної допомоги у випадках отруєння дикватом має бути невідкладним. Першочерговими заходами є ретельне промивання очей та ротової порожнини проточною водою для зменшення місцевого подразнення. З метою обмеження абсорбції токсиканта проводять індукцію блювання та промивання шлунка із застосуванням ентеросорбентів – фулерової землі, бентоніту, активованого вугілля тощо. Після цього призначають осмотичні проносні засоби (10% розчин манітолу, 20% сульфат магнію) та медикаменти для стимуляції форсованого діурезу, зокрема фуросемід або лазикс, що сприяє пришвидшеному виведенню диквату з організму [20].

## РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкти та методи досліджень

У якості біологічного об'єкта дослідження використано білих безпородних лабораторних щурів обох статей різного віку, які утримувались у віварії згідно з вимогами належної лабораторної практики, етичних норм та принципів гуманного поводження з лабораторними тваринами відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

До дослідження було залучено три вікові групи тварин:

- I група (підлітково віку, 60 днів): маса тіла –  $86 \pm 15$  г;
- II група (репродуктивного віку, 150 днів): маса тіла –  $129 \pm 20$  г;
- III група (зрілого віку, 360 днів): маса тіла –  $211 \pm 52$  г.

Тварин утримували в умовах природного світлового режиму (12:12 світло/темрява) при температурі 21–23 °С і відносній вологості 50–60 %. Упродовж усього періоду дослідження тварини мали вільний доступ до води та збалансованого раціону.

Модель експерименту передбачала поділ різновікових тварин на дві дослідні групи: контроль (інтактні тварини) та тварини, яким моделювали токсичне ураження промисловим ксенобіотиком дикватом.

Моделювання токсичного ураження проводили шляхом одноразового внутрішньошлункового введення диквату у дозі 115,5 мг/кг маси тіла [21].

Через 24 години після введення препарату тварин виводили з експерименту методом цервікальної дислокації під дією легкого ефірного наркозу.

### 2.2. Отримання сироватки крові

Сироватка крові є рідкою частиною крові, що утворюється після її зсідання та видалення згустку. На відміну від плазми, сироватка не містить

фібриногену та інших білків, проте включає широкий спектр компонентів: воду, електроліти, гормони, продукти метаболізму, антитіла та інші низькомолекулярні речовини. Завдяки цьому вона є універсальним матеріалом для проведення біохімічного, токсикологічного, імунологічного та клінічного аналізу.

У межах даного дослідження отримання сироватки здійснювали шляхом забору крові у лабораторних тварин із вени в стерильні пробірки без додавання антикоагулянтів. Забрану кров залишали при кімнатній температурі на 20–30 хвилин, що забезпечувало її повне зсідання. Після цього пробірки центрифугували при швидкості 3000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин. Унаслідок центрифугування згусток осідав на дно пробірки, а над ним утворювався шар прозорої рідини – сироватки.

Сироватку обережно відбирали мікропіпеткою в нові стерильні пробірки, уникаючи контакту з форменими елементами крові або залишками фібрину. Для збереження біохімічної стабільності зразки використовували для аналізу одразу після отримання або зберігали при температурі +4 °С не довше 24 годин. У разі необхідності тривалого зберігання зразки заморожували при температурі –20 °С.

Отриману сироватку використовували для визначення концентрації сечовини та креатиніну.

### **2.3. Визначення концентрації сечовини в сироватці крові**

Суть методу полягає в тому, що сечовина розкладається ферментом уреазою з утворенням аміаку та вуглекислого газу. Утворений аміак взаємодіє з гіпохлоритом та саліцилатами, що призводить до утворення зеленого забарвленого розчину. Інтенсивність забарвлення, яку можна виміряти на хвилях світла з діапазону 540 до 600 нм, є пропорційною до концентрації сечовини у зразку.

Комплект для тестування включає буферний розчин з певним вмістом фосфатного буферу, саліцилату натрію, нітропрусиду натрію та ЕДТА кислоти; гіпохлоритний реагент; стандартний розчин сечовини; і концентровану уреазу. Перед початком експерименту рекомендовано всі реактиви адаптувати до кімнатної температури впродовж 30 хвилин. Для приготування робочого розчину необхідно змішати чотири частини буферного розчину з однією частиною гіпохлоритного реагенту. Такий розчин може залишатися стабільним до одного місяця, якщо його зберігати при температурі від 2 до 8°C.

Процес визначення починається з підготовки трьох пробірок: дослідної калібрувальної та контрольної. В дослідну і калібрувальну пробірки додають по 0,01 мл зразка і стандартного розчину сечовини відповідно, тоді як контрольна пробірка залишається порожньою. До кожної пробірки додають 1 мл ензимного реагенту, змішують та інкубують. Після цього у всі пробірки додають гіпохлоритний реагент, змішують і знову інкубують. Оптичну густану вимірюють порівняльно з контрольною пробою.

“Розрахунок концентрації сечовини в зразку проводять за формулою:

$$C_{\text{сечовини}} = E_{\text{дос}}/E_{\text{кал}} \times 10, \text{ де}$$

$C_{\text{сечовини}}$  – концентрація сечовини у дослідній пробі, ммоль/л;

$E_{\text{дос}}$  – оптична густану дослідної проби, од. оптичної густану;

$E_{\text{кал}}$  – оптична густану калібрувальної проби, од. оптичної густану;

10 – концентрація сечовини в калібрувальному розчині.”

#### **2.4. Визначення вмісту креатиніну у сироватці крові**

Методика вимірювання базується на реакції між креатиніну і пікриноюю кислотою в алкалічному середовищі, що породжує з'єднання з жовто-червоним кольором (тринітроциклогексادیєновий похідний). Ступінь забарвлення безпосередньо корелює з рівнем креатиніну у зразку. Визначення

креатиніну у кров'яній плазмі здійснюється після видалення білків за допомогою розчину трихлороцтової кислоти.

Комплект реагентів містить: пікринову кислоту у концентрації  $(0,040 \pm 0,002)$  М; трихлороцтову кислоту  $(1,220 \pm 0,061)$  М; розчин гідроксиду натрію 2,3 N або суху форму; ліофілізований креатиніну для створення каліброваного розчину  $(442,5 \pm 22,0)$  мкмоль/л або готовий розчин креатиніну такої ж концентрації.

“Процедура визначення передбачає використання трьох чистих центрифужних пробірок (для дослідження, калібрування, та холостий зразок). В дослідну і калібрувальну проби додають по 1,0 мл дистильованої води, а в холостий зразок – 1,5 мл. Далі до дослідної проби вносять 0,5 мл сироватки крові, у калібрувальну – 0,5 мл калібрувального розчину, а холостий зразок залишають пустим. В усі три пробірки додають по 0,5 мл розчину трихлороцтової кислоти, ретельно змішують і центрифугують протягом 5 хвилин зі швидкістю 3000 об/хв. Після цього з верхньої частини кожної пробірки відбирають рідину і переносять у нові чисті пробірки. Потім у кожному з них додають по 0,5 мл розчину гідроксиду натрію та пікринової кислоти, перемішують і залишають на 20 хвилин при кімнатній температурі. Потім виконують фотометрію з холостою пробою в якості контролю.

Розрахунок концентрації креатиніну у досліджуваному зразку проводять використовуючи формулу:

$$C = E_{\text{дос}} / E_{\text{кал}} \times 5,0(442,5), \text{ де}$$

$C$  – концентрація креатиніну у дослідній пробі, (мкмоль/л);

$5,0(442,5)$  – калібрувальна концентрація креатиніну, (мкмоль/л);

$E_{\text{дос}}$  – оптична густина дослідної проби, од. оптичної густини;

$E_{\text{кал}}$  – оптична густина калібрувальної проби, од. оптичної густини.”

## 2.5. Визначення вмісту мікроальбуміну в сечі

Принцип методу ґрунтується на тому, що протеїни (альбумін) в сечі при зв'язуванні з пірогалолом червоним у присутності молібдату утворює забарвлений комплекс із інтенсивністю пропорційною концентрації протеїнів.

Для дослідження вмісту мікроальбуміну в сечі використовували дослідну, еталонну та холосту проби. До кожної із вказаних проб додавали по 1 мл робочого реагенту в складі 60 мкМ пірогалолу червоного, 40 мкМ натрію молібдату, 1,04 мМ натрію оксалату, 3,47 мМ натрію бензоату, 1 М метанолу та 50 мМ сукцинату. До дослідного зразка вносили 0,02 мл біологічного матеріалу (сечі), еталонного – 0,02 мл стандартного розчину альбуміну (1 г/л), холостої проби – 0,02 дистильованої води.

Вміст усіх пробірок перемішували, інкубували 5 хв на водяній бані при температурі 37°C. Екстинцію дослідних та еталонної проби вимірювали навпроти холостої при довжині хвилі 598 нм в кюветі з товщиною робочого шару 10 мм. Забарвлення реакційної суміші стабільне протягом 1 год.

Вміст мікроальбуміну в сечі розраховували за формулою:

$$C_{\text{альбуміну}} = E_{\text{дос.}} / E_{\text{етал.}} \times C_{\text{етал.}}, \text{ де}$$

$E_{\text{досл.}}$  – екстинція дослідної проби;

$E_{\text{етал.}}$  – екстинція еталонної проби;

$C_{\text{етал}}$  – концентрація еталонної проби – 1 г/л (1000 мг/л).

## 2.6. Статистична обробка результатів

Аналіз результатів проводили з використанням Microsoft Excel та функціоналу пакету “Аналізу даних”. Вірогідність відмінностей визначали за допомогою t-критерією Стюдента (двовибірковий t-тест), вважаючи значущими значення при  $p \leq 0,05$ .

### РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

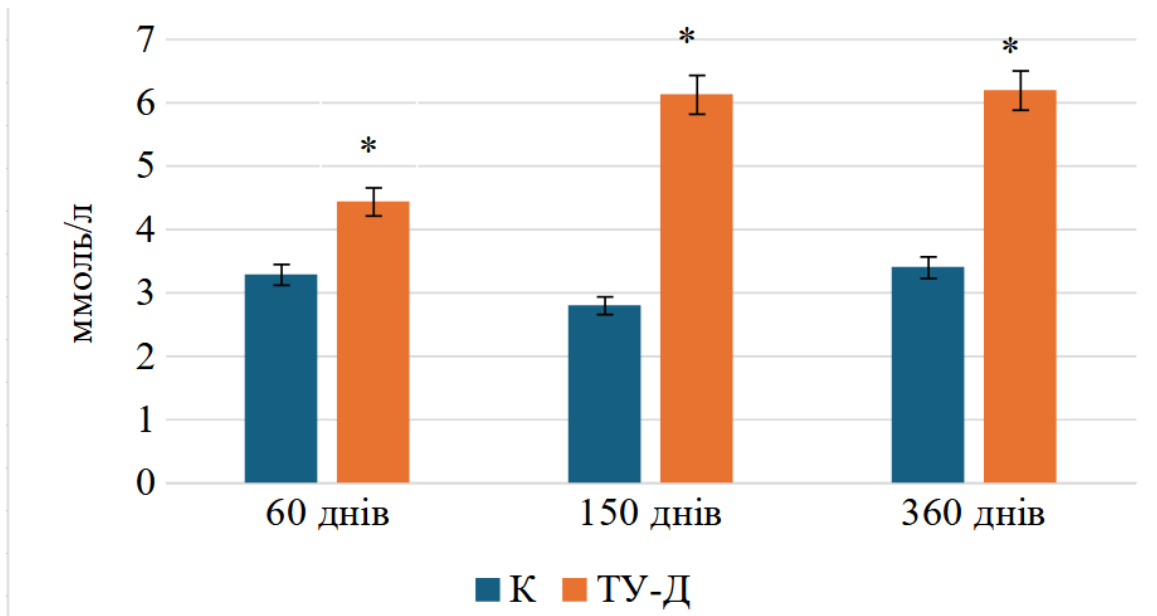
Нирки відіграють ключову роль у підтриманні гомеостазу організму, здійснюючи фільтрацію крові, виведення метаболітів, регуляцію водно-сольового балансу та артеріального тиску. Порушення їхньої функції, зокрема внаслідок токсичного ураження, становить серйозну медико-біологічну проблему, особливо з урахуванням впливу ксенобіотиків, таких як гербіциди. Одним із таких є дикват (дикват дибромід) – високотоксична сполука, що широко застосовується в сільському господарстві. Дикват викликає оксидативний стрес, порушує клітинну цілісність та метаболічні процеси, зокрема в нефроцитах, що призводить до гострого ураження нирок [22].

Біохімічні маркери, такі як сечовина та креатинін, є класичними показниками функціонального стану нирок. Вони дозволяють оцінити ефективність клубочкової фільтрації, ступінь накопичення продуктів азотистого обміну в крові та загальний стан видільної системи. Підвищення рівня цих метаболітів у сироватці крові є раннім індикатором ниркової дисфункції, що робить їх незамінними в експериментальних токсикологічних дослідженнях.

Особливої уваги потребує оцінка вікових особливостей у відповіді організму на токсичне навантаження. Морфофункціональний стан нирок змінюється з віком: у молодих, дорослих і старих тварин спостерігаються різні темпи метаболізму, активність ферментативних систем, чутливість до токсинів. Це зумовлює різну вираженість токсичних ефектів диквату.

Результати проведених досліджень показали, що в групах контрольних тварин (група К) незалежно від віку концентрація сечовини статистично вірогідно не змінюється. Натомість у сироватці крові щурів, яким моделювали токсичне ураження дикватом, рівень даного показника перевищував значення контролю (у щурів 60-денного віку – в 1,4 рази, 150-денних – 2,2 рази, 360-денних – 2 рази). З даного рисунку видно, що найвищі значення досліджуваного показника в щурів із дикват-індукованим токсичним

ураженням зареєстровано в тварин репродуктивного (150 днів) та зрілого (360 днів) віку порівняно з контрольними величинами (рис 3.1).



**Рис. 3.1. Вміст сечовини в сироватці крові щурів різного віку за умов дикват-індукованого ураження**

*Примітка (тут і надалі):*

*К – контроль;*

*ТУ-Д – тварини, яким моделювали токсичне ураження дикватом;*

*\* – статистично достовірна похибка порівняно з контролем,  $p \leq 0,05$ .*

Підвищення рівня сечовини в сироватці крові при введенні диквату може бути пов'язане з його токсичним впливом на нирки. З літературних джерел [23] відомо, що дикват спричиняє гостре ураження ниркових каналців (гострий тубулярний некроз), що призводить до порушення їхньої фільтраційної та екскреторної функції. Внаслідок цього продукти азотистого обміну, зокрема сечовина, не виводяться належним чином із організму, що призводить до їх накопичення в крові (азотемії).

Як відомо, механізми токсичної дії диквату проявляються через індукцію оксидативного стресу, оскільки дикват є біпіридиновим гербіцидом, що утворює реактивні форми кисню через редокс-цикли. Надлишкові АФК

пошкоджують мембрани нефроцитів, спричиняючи некроз або апоптоз ниркових клітин [24].

З іншого боку, це може бути пошкодження проксимальних каналців та клубочків: особливо вразливими є клітини проксимальних звивистих каналців, де відбувається активний транспорт речовин. Їх пошкодження призводить до зниження ефективності екскреції азотистих метаболітів.

Разом з тим можливе зменшення швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ). Внаслідок ушкодження ендотелію капілярів клубочків та активації запальних процесів спостерігається зменшення ШКФ, що перешкоджає ефективному виведенню сечовини [25].

Враховуючи те, що найвищі показники рівня сечовини в сироватці крові щурів за умов токсичного ураження дикватом зареєстровані нами у групі тварин репродуктивного (150 днів) та зрілого (360 днів) віку, отримані нами результати можна пояснити наступним чином.

У репродуктивному віці тварини мають активний обмін речовин і розвинену систему детоксикації. Проте саме через високу метаболічну активність клітини більш чутливі до токсичного стресу – чим інтенсивніший обмін, тим більший потенціал ушкодження при утворенні надмірної кількості активних форм кисню.

У зрілих тварин (360 днів) починають виявлятися вікові зміни в мікроциркуляції та функціональній активності нефронів – зниження кількості функціонально активних нефронів, зменшення резистентності до стресу, порушення енергетичного забезпечення клітин. Це підвищує вразливість до токсичного навантаження. Також з віком знижується активність антиоксидантних ферментів (наприклад, супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази), що посилює вплив вільнорадикального ушкодження [26].

У результаті цих змін сечовина, як кінцевий продукт катаболізму білків, не виводиться належним чином нирками, а її концентрація в крові підвищується.

Отже, підвищення рівня сечовини в сироватці крові репродуктивних і зрілих щурів при дії диквату можна пояснити комбінацією наступних факторів: прямою токсичною дією на нефрони через оксидативний стрес, зниженням ефективності клубочкової фільтрації, віковою зміною чутливості ниркових структур до ушкодження, дисбалансу між утворенням АФК і здатністю клітин їх нейтралізувати.

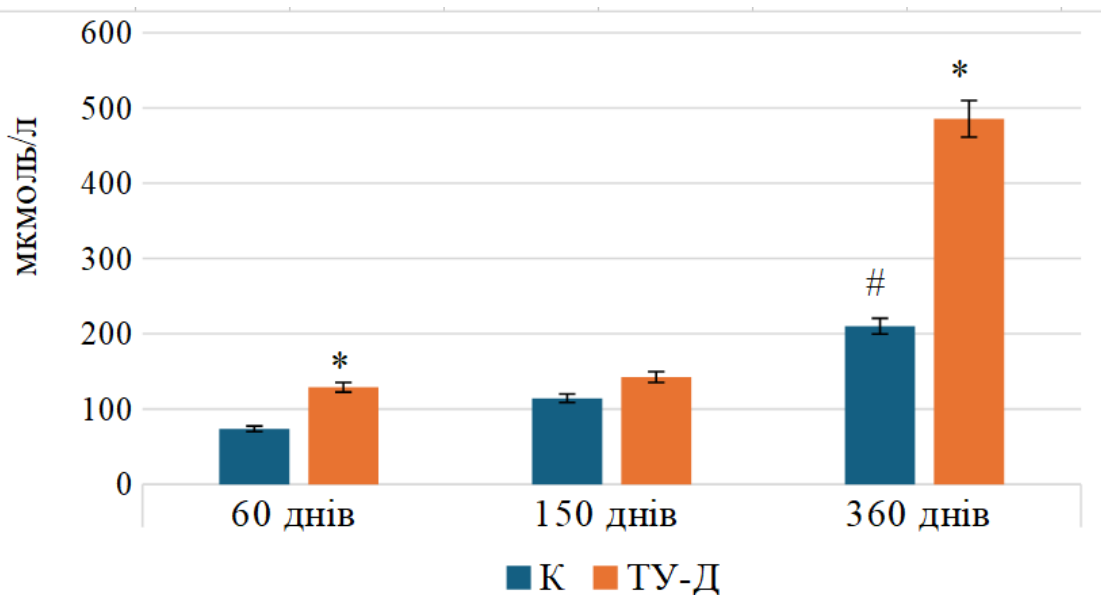
У ході дослідження функціонального стану нирок ключовим первинним показником виступає рівень сечовини в сироватці крові, оскільки вона є основним продуктом метаболізму білків і виводиться з організму через нирки шляхом клубочкової фільтрації. Підвищення концентрації сечовини свідчить про порушення екскреторної функції нирок. Проте рівень сечовини є менш специфічним показником, оскільки на нього впливають також позаниркові чинники: стан печінки, білкове навантаження, ступінь дегідратації, фізіологічний стрес тощо [27].

Тому для підвищення точності оцінки ниркової дисфункції доцільно доповнити аналіз дослідженням ще одного чутливого і більш специфічного біохімічного маркера – креатиніну. Креатинін – це низькомолекулярна сполука, яка утворюється в результаті метаболізму креатину в м'язах і виводиться нирками виключно шляхом клубочкової фільтрації, практично без реабсорбції і з незначною секрецією. Завдяки цьому рівень креатиніну в сироватці крові відображає саме фільтраційну здатність нирок [28].

Таким чином, перехід до дослідження креатиніну дозволяє уточнити характер і ступінь порушень клубочкової фільтрації, зменшити вплив позаниркових факторів на результати оцінки, здійснити більш об'єктивну порівняльну оцінку функціонального стану нирок у різновікових групах тварин.

Нами встановлено, що в інтактних тварин 360-денного віку рівень креатиніну достовірно перевищує значення даного показника у групах щурів підліткового та репродуктивного віку.

У нормі рівень креатиніну в сироватці крові може поступово підвищуватись із віком, навіть за відсутності патологій. Це зумовлено кількома фізіологічними чинниками: зниження швидкості клубочкової фільтрації (із віком поступово зменшується кількість функціонально активних нефронів, знижується ефективність кровопостачання нирок, зменшується перфузія клубочків, і, як наслідок, уповільнюється виведення креатиніну, що призводить до його накопичення в крові) [29]; змінами в м'язовій масі (наприклад, у зрілих і літніх тварин (і людей) може знижуватися загальна м'язова маса (саркопенія), але при цьому відносна продукція креатиніну зберігається); фізіологічними перебудовами метаболізму (з віком знижується активність ферментних систем, у тому числі в мітохондріях, що впливає на енергетичний обмін і синтез креатиніну, зміни у гомеостазі води та електролітів можуть впливати на концентрацію креатиніну в крові); зниженням тубулярного транспорту (з віком зменшується здатність ниркових каналців до ефективного транспорту речовин, навіть невеликі зміни в функції каналців можуть порушувати екскрецію креатиніну) [30].



**Рис. 3.2. Вміст креатиніну в сироватці крові щурів за умов дикват-індукованого ураження**

Отже, навіть за фізіологічних умов, без токсичного чи патологічного навантаження, поступове підвищення рівня креатиніну є відображенням вікових змін у нирках – зниження фільтраційної здатності, зменшення активних нефронів і перебудови метаболізму. Це варто враховувати при інтерпретації результатів біохімічного аналізу та при порівнянні вікових груп у наукових дослідженнях.

Водночас за умов токсичного ураження дикватом вміст креатиніну в сироватці крові достовірно зростає лише в групах щурів 60-денного віку (підліткові) в 1,7 рази та 360-денного віку (зрілі) в 2,3 рази відповідно порівняно зі значеннями контрольних величин вказаних вікових груп (рис. 3.2).

У період 30–60 днів у щурів нирки ще проходять функціональне дозрівання, особливо тубулярний апарат. Нефрони в цей період можуть бути морфологічно сформованими, але метаболічно ще не повністю стабільними, що робить їх більш чутливими до оксидативного стресу. Антиоксидантна система (глутатіон, супероксиддисмутаза тощо) ще не досягає максимальної активності, що посилює токсичну дію диквату [31].

Токсичне навантаження, особливо при системному стресі, може посилити розпад м'язових білків, що також сприяє додатковому надходженню креатиніну в кров.

Таким чином, можна припустити, що в щурів підліткового віку під дією диквату підвищення креатиніну є результатом двох факторів одночасно: токсичне пошкодження нирок, що знижує здатність до екскреції, а також активна продукція креатиніну через ріст і метаболізм, що створює додаткове навантаження на нирки.

Отже, підвищення вмісту креатиніну в крові підліткових (60-денних) щурів після дії диквату свідчить про поєднання вікової фізіологічної вразливості та токсичного ураження ниркової тканини. Цей показник є інформативним для виявлення ранніх ефектів нефротоксичності та

демонструє, що навіть відносно молоді організми з активним метаболізмом можуть мати високу чутливість до оксидативного стресу, викликаного дикватом.

Водночас підвищення рівня креатиніну в сироватці крові щурів зрілого віку після впливу диквату є ознакою вираженого порушення клубочкової фільтрації внаслідок токсичного ураження нирок. У тварин цієї вікової групи (приблизно 360 днів) існує низка фізіологічних та патофізіологічних факторів, що сприяють підвищенню чутливості до дії токсикантів.

Дикват спричиняє масивний оксидативний стрес, утворюючи активні форми кисню, які ушкоджують: клітини проксимальних каналців, ендотелій клубочків, мембрани мітохондрій у нефроцитах. Це порушує механізм клубочкової фільтрації, що унеможлиблює ефективне виведення креатиніну з організму, сприяючи його накопиченню в крові. Хоча функція нирок у зрілому віці ще зберігається на достатньому рівні, вже починається вікова редукція кількості функціональних нефронів [32]. У зрілому віці антиоксидантний захист (глутатіон, супероксиддисмутаза, каталаза) вже знижується, що робить тканини менш стійкими до дії вільних радикалів.

У літературі зазначається, що токсичний стрес може викликати загальні метаболічні порушення, зокрема дегідратацію, що концентрує креатинін у крові; гіпоксію тканин, яка погіршує метаболічні процеси в нирках; активацію катаболізму м'язової тканини – додаткове джерело креатиніну.

Отже, підвищення вмісту креатиніну в крові зрілих щурів після токсичного ураження дикватом є результатом поєднання вікової редукції функціональних можливостей нирок і потужного ушкоджуючого ефекту диквату. Це свідчить про те, що у зрілому віці нирки стають менш стійкими до токсичного навантаження, що призводить до яскраво вираженої нефротоксичності, яка проявляється зростанням рівня креатиніну в крові.

Отже, за умов токсичного ураження дикватом в сироватці крові щурів різновікових груп спостерігається зростання рівня сечовини та креатиніну з найвищими значеннями у тварин 360-денного (зрілого) віку.

У комплексі, сечовина і креатинін утворюють надійну пару індикаторів для оцінки нефротоксичності диквату. Їх одночасне визначення дозволяє зробити висновки не лише про наявність порушень, а й про їх механізм, вираженість та залежність від вікових особливостей. Такий підхід забезпечує глибше розуміння патобіохімічних змін у нирках під впливом токсичного агента.

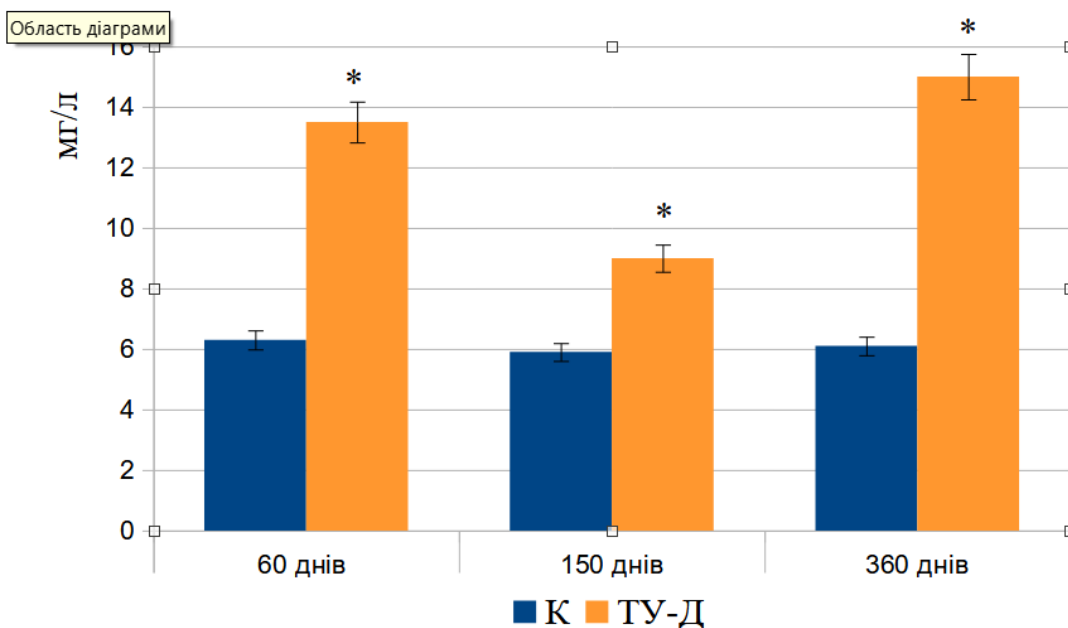
Отже, аналіз рівнів сечовини та креатиніну дозволяє оцінити вже наявне порушення фільтраційної функції нирок. Втім, ці показники змінюються переважно на пізніших етапах патологічного процесу. Для раннього виявлення нефропатій, особливо важливим є дослідження мікроальбумінурії – наявності незначної кількості альбуміну в сечі, що є раннім маркером гломерулярного ушкодження.

Мікроальбумін – патологічна кількість альбуміну в сечі, яка становить 30–300 мг/добу. Сам альбумін – це головний білок плазми крові, що синтезується в печінці та виконує транспортну, буферну та осмотичну функції. У фізіологічних умовах альбумін практично не виводиться із сечею, оскільки клубочковий фільтр нирок має високу вибірковість і перешкоджає проходженню великих та негативно заряджених білків [33].

Поява мікроальбуміну в сечі є результатом порушення фільтраційного бар'єру нефрону або зниження здатності проксимальних каналців до реабсорбції білків. Основними компонентами фільтраційного бар'єру є ендотелій клубочкових капілярів, базальна мембрана та подоцити. У нормі невелика кількість альбуміну, яка все ж проходить крізь фільтраційний бар'єр, захоплюється та метаболізується клітинами каналців. Якщо ж бар'єр пошкоджено або функція каналців порушена, альбумін починає виводитися із сечею у підвищених концентраціях, що і проявляється як мікроальбумінурія.

Мікроальбумінурія є чутливим раннім маркером порушення функціонального стану нирок, який дозволяє виявити гломерулярну або канальцеву дисфункцію до появи клінічно вираженої протеїнурії чи зниження швидкості клубочкової фільтрації. Її виявлення має ключове значення для діагностики початкових стадій нефропатій, включаючи токсичні, метаболічні (наприклад, діабетична нефропатія) чи гемодинамічні (при артеріальній гіпертензії) ураження нирок [34].

Крім того, рівень мікроальбуміну в сечі є інформативним прогностичним індикатором, що дозволяє оцінити ризик розвитку хронічної хвороби нирок, а також відстежувати ефективність профілактичних або терапевтичних заходів у разі виявлених відхилень.



**Рис. .3.3. Вміст мікроальбуміну в сечі щурів за умов дикват-індукованого ураження**

За результатами наших досліджень виявлено вікові особливості зміни рівня мікроальбуміну в сечі щурів після токсичного ураження дикватом. Як видно з рисунку 3.3 поява мікроальбуміну в сечі спостерігається у всіх дослідних вікових групах щурів після токсичного ураження дикватом. Варто

зазначити, що за умов надходження токсичних доз даного ксенобіотика максимальні значення вмісту мікроальбуміну в сечі зареєстровано в групах щурів 60-денного віку (підліткові) в 7,2 рази та 360-денного віку (зрілі) в 8,9 рази відповідно порівняно зі значеннями контрольних величин вказаних вікових груп (рис. 3.3).

Отримані результати можна пояснити таким чином. Наприклад, у підлітковому віці (щурів 60-денного віку) процеси дозрівання нефронів ще тривають. Хоча структура нирки вже сформована, бар'єрна здатність гломерулярної мембрани та реабсорбційна функція проксимальних канальців можуть бути ще недостатньо ефективними. Це створює умови для підвищеної проникності до білків, особливо в умовах стресового або токсичного навантаження.

Оскільки альбумін зазвичай не проходить через інтактну гломерулярну базальну мембрану, підвищення його концентрації в сечі свідчить про структурне ушкодження компонентів фільтраційного бар'єру, зокрема подоцитів, які є особливо вразливими до токсинів. У підліткових тварин така структурна нестабільність проявляється швидше та інтенсивніше.

Мікроальбумінурія має особливу наукову цінність як маркер раннього нефротоксичного ефекту. Під впливом диквату відбувається розвиток інтенсивного оксидативного стресу, що ушкоджує ключові компоненти нефрону (ендотеліальні клітини клубочків втрачають бар'єрну функцію, порушується структура гломерулярної базальної мембрани, зменшується її негативний заряд, що сприяє проникненню білків, ушкоджуються подоцити, які забезпечують селективну фільтрацію, пригнічується реабсорбційна здатність канальцевого епітелію) [35].

У результаті цих змін значно зростає проникність фільтраційного бар'єру та знижується зворотне захоплення альбуміну, що сприяє появі мікроальбуміну в сечі вже на ранніх етапах ушкодження ниркової тканини.

Таким чином, при дикват-індукованій нефропатії мікроальбумінурія є раннім, біологічно значущим індикатором ушкодження нефронів, що дозволяє не лише діагностувати патологічний процес на доклінічному рівні, але й оцінити динаміку токсичного ураження та потенційну ефективність захисних втручань.

Підвищення рівня мікроальбуміну в сечі у підліткових щурів під впливом диквату свідчить про поєднану дію незрілої морфофункціональної організації нефронів та вираженого оксидативного ушкодження, що разом сприяють ранній та значній втраті білка із сечею. Це підкреслює високу чутливість молодого організму до нефротоксичних факторів та доцільність використання мікроальбумінурії як маркера субклінічного ураження [36].

Поява значної кількості мікроальбуміну в сечі зрілих щурів (360 днів) після введення диквату, ймовірно, вказує на розвиток ранніх проявів гломерулярної дисфункції. Токсичний вплив диквату реалізується переважно через генерацію надмірної кількості активних форм кисню, що спричиняють оксидативне ушкодження клітин ниркової паренхіми. Гломерулярні ендотеліоцити, які мають велику кількість мітохондрій і високу метаболічну активність, є особливо вразливими до дії вільних радикалів. Пошкодження цих клітин призводить до підвищення проникності судинної стінки для білків низької молекулярної маси, зокрема альбуміну.

Крім того, у зрілому віці у щурів природно знижується активність основних компонентів антиоксидантної системи – супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, що ускладнює нейтралізацію активних форм кисню та сприяє накопиченню оксидативних пошкоджень. Це супроводжується зниженням компенсаторно-регенераторних властивостей нефроцитів, які зазвичай відновлюють структуру пошкоджених фільтраційних бар'єрів у молодому організмі. Таким чином, у щурів зрілого віку токсичний ефект диквату проявляється більш виражено та тривало.

Крім прямого ушкодження нефронів, оксидативний стрес, індукований дикватом, активує прозапальні сигнальні шляхи, що сприяє подальшому ураженню клубочкових структур через медіатори запалення (IL-6, TNF- $\alpha$ ), порушення мікроциркуляції та розвиток ендотеліальної дисфункції. Це створює умови для персистуючого підвищення проникності клубочків, що проявляється мікроальбумінурією навіть при відсутності змін у загальному рівні протеїнурії.

Отже, за токсичної дії промислового ксенобіотика диквату в сечі різновікових щурів спостерігається поява мікроальбуміну – з найвищими значення у тварин підліткового (60 днів) та зрілого (360 днів) віку, що можна розглядати маркером раннього токсичного ураження клубочкового апарату нирок.

Отримані результати вказують на те, що функціональний резерв ниркової тканини у за даних умов знижений, а отже, токсичне навантаження призводить до швидшого порушення її бар'єрних і фільтраційних властивостей.

## ВИСНОВКИ

1. За умов токсичного ураження дикватом в сироватці крові щурів усіх різновікових груп спостерігається зростання рівня сечовини з найвищими значеннями у репродуктивних та зрілих тварин.

2. Надходження токсичних доз диквату призводить до статистично вірогідного зростання рівня креатиніну в сироватці крові щурів 60-денного та 360-денного віку з найвищими показниками у зрілому віці.

2. За токсичної дії промислового ксенобіотика диквату в сечі різновікових щурів спостерігається поява мікроальбуміну, причому вищий рівень зареєстровано у тварин підліткового (60 днів) та зрілого (360 днів) віку, що засвідчує тяжкість ураження клубочкового апарату нирок в зазначених вікових групах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kidney and lung injury in rats following acute diquat exposure Y. Wu et al. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022. V. 23, no. 4. URL:<https://doi.org/10.3892/etm.2022.11201>
2. Guo H. Paraquat and Diquat: Recent Updates on Their Pretreatment and Analysis Methods since 2010 in Biological Samples. *Molecules*. 2023. V. 28, no. 2. P. 684. URL:<https://doi.org/10.3390/molecules28020684>
3. High-dose diquat poisoning: a case report Y. Huang et al. *Journal of International Medical Research*. 2021. V. 49, no. 6. P. 030006052110261. URL: <https://doi.org/10.1177/03000605211026117>
4. Magalhães N. Human and experimental toxicology of diquat poisoning: Toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment. *Human & Experimental Toxicology*. 2018. V. 37, no. 11. P. 1131–1160. URL: <https://doi.org/10.1177/0960327118765330>
5. Chronic Exposure to Diquat Causes Reproductive Toxicity in Female Mice J.-Q. Zhang et al. *PLOS ONE*. 2016. V. 11, no. 1. P. e0147075. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147075>
6. Multi-Omics Analyses Reveal the Mechanisms of Early Stage Kidney Toxicity by Diquat H. Zhang et al. *Toxics*. 2023. V. 11, no. 2. P. 184. URL: <https://doi.org/10.3390/toxics11020184>
7. Blood urea nitrogen/creatinine ratio in heart failure: Systematic review and meta-analysis Y. Zhou et al. *PLOS ONE*. 2024. V. 19, no. 5. P. e0303870. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0303870>
8. Ho H.-J. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Chronic Kidney Disease. *Cells*. 2022. V. 12, no. 1. P. 88. URL: <https://doi.org/10.3390/cells12010088>
9. Immunology of Kidney Disease O. Foresto-Neto et al. *Annual Review of Immunology*. 2024. V. 42, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-090122-045843>

10. The Metabolism of Creatinine and Its Usefulness to Evaluate Kidney Function and Body Composition in Clinical Practice M. Ávila et al. *Biomolecules*. 2025. V. 15, no. 1. P. 41. URL: <https://doi.org/10.3390/biom15010041>
11. Recovery Dynamics and Prognosis After Dialysis for Acute Kidney Injury H.-C. Pan et al. *JAMA Network Open*. 2024. V. 7, no. 3. P. e240351. URL: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2024.0351>
12. Delanaye P. Serum Creatinine: Not So Simple!. *Nephron*. 2017. V. 136, no. 4. P. 302–308. URL: <https://doi.org/10.1159/000469669>
13. Estimated glomerular filtration rate in observational and interventional studies in chronic kidney disease M. Provenzano et al. *Journal of Nephrology*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1007/s40620-024-01887-x>
14. Common questions and misconceptions about creatine supplementation: what does the scientific evidence really show? J. Antonio et al. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2021. V. 18, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12970-021-00412-w>
15. Serum Uric Acid and Mortality Risk Among Hemodialysis Patients A. M. Zawada et al. *Kidney International Reports*. 2020. V. 5, no. 8. P. 1196–1206. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.05.021>
16. Singh S. Recent advancements in urea biosensors for biomedical applications. *IET Nanobiotechnology*. 2021. V. 15, no. 4. P. 358–379. URL: <https://doi.org/10.1049/nbt2.12050>
17. The urea-to-creatinine ratio as an emerging biomarker in critical care: a scoping review and meta-analysis M. C. Paulus et al. *Critical Care*. 2025. V. 29, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13054-025-05396-6>
18. Jones G. M. Mechanisms of Toxicity, Clinical Features, and Management of Diquat Poisoning: A Review. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2000. V. 38, no. 2. P. 123–128. URL: <https://doi.org/10.1081/clt-100100926>

19. Zhang W. R. Biomarkers of Acute and Chronic Kidney Disease. *Annual Review of Physiology*. 2019. V. 81, no. 1. P. 309–333. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114605>
20. Acute diquat poisoning case with multiorgan failure and a literature review: A case report C.-Y. Fan et al. *World Journal of Clinical Cases*. 2023. V. 11, no. 27. P. 6565–6572. URL: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i27.6565>
21. Kidney and lung injury in rats following acute diquat exposure Y. Wu et al. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022. V. 23, no. 4. URL: <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11201>
22. Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Infection and Immunity A. Mukherjee et al. *Biomolecules*. 2024. V. 14, no. 6. P. 670. URL: <https://doi.org/10.3390/biom14060670>
23. Effect of sex on glomerular filtration rate in programmed rats by prenatal dexamethasone J. Jain et al. *Physiological Reports*. 2019. V. 7, no. 12. URL: <https://doi.org/10.14814/phy2.14154>
24. Fattah H. How Do Kidneys Adapt to a Deficit or Loss in Nephron Number?. *Physiology*. 2019. V. 34, no. 3. P. 189–197. URL: <https://doi.org/10.1152/physiol.00052.2018>
25. Acute on chronic kidney disease in cats: Etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and outcome H. Chen et al. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2020. V. 34, no. 4. P. 1496–1506. URL: <https://doi.org/10.1111/jvim.15808>
26. Estimating Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine and Cystatin C L. A. Inker et al. *New England Journal of Medicine*. 2012. V. 367, no. 1. P. 20–29. URL: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1114248>
27. Peralta C. A. Detection of Chronic Kidney Disease With Creatinine, Cystatin C, and Urine Albumin-to-Creatinine Ratio and Association With Progression to End-Stage Renal Disease and Mortality. *JAMA*. 2011. V. 305, no. 15. P. 1545. URL: <https://doi.org/10.1001/jama.2011.468>

28. Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease J. A. Hall et al. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2014. V. 28, no. 6. P. 1676–1683. URL: <https://doi.org/10.1111/jvim.12445>
29. Woroniecki R. P. Progression of Glomerular and Tubular Disease in Pediatrics. *Seminars in Nephrology*. 2009. V. 29, no. 4. P. 412–424. URL: <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2009.03.016>
30. Mailloux R. J. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants*. 2020. V. 9, no. 6. P. 472. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>
31. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants K. Jomova et al. *Archives of Toxicology*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>
32. Hommos M. S. Structural and Functional Changes in Human Kidneys with Healthy Aging. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017. V. 28, no. 10. P. 2838–2844. URL: <https://doi.org/10.1681/asn.2017040421>
33. Spot urinary microalbumin concentration, metabolic syndrome and type 2 diabetes: Tehran lipid and glucose study Z. Gaeini et al. *BMC Endocrine Disorders*. 2022. V. 22, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12902-022-00976-x>
34. Evaluation of microalbuminuria in obesity phenotypes A. Alagh et al. *Journal of Family and Community Medicine*. 2022. V. 29, no. 2. P. 162. URL: [https://doi.org/10.4103/jfcm.jfcm\\_57\\_22](https://doi.org/10.4103/jfcm.jfcm_57_22)
35. A Meta-analysis of the Association of Estimated GFR, Albuminuria, Age, Race, and Sex With Acute Kidney Injury M. E. Grams et al. *American Journal of Kidney Diseases*. 2015. V. 66, no. 4. P. 591–601. URL: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.02.337>

36. Rodrigues M., Dias C. B. Microalbuminuria in non diabetic population as an marker of nephropathy. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2016. V. 38, no. 2.  
URL: <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20160029>

## ДОДАТКИ

### Охорона праці та безпеки у надзвичайних ситуаціях

Під час роботи в лабораторії необхідно дотримуватися наступних заходів безпеки:

- ✓ забороняється заходити в лабораторію в верхньому одязі
- ✓ працювати в біохімічній лабораторії можна тільки в спеціальному халаті, оскільки ймовірна можливість забруднення, псування одягу при потрапляння їдких реактивів.

### Правила роботи з реактивами

- ✓ концентровані кислоти та луги повинні знаходитись під витяжною шафою;
- ✓ усі дослідження з отруйними речовинами та речовинами з їдким запахом проводити тільки під витяжною шафою;
- ✓ наливати або насипати реактиви слід тільки над столом ;
- ✓ не слід залишати відкритими банки з реактивами;
- ✓ пролиті або розсипані реактиви потрібно негайно видалити зі столу, витерти стіл ганчіркою та промити водою;
- ✓ пролиті концентровані кислоти необхідно засипати піском, потім зібрати пісок лопаткою. Дане місце необхідно промити розчином соди та витерти ганчіркою;
- ✓ під час роботи з органічними розчинниками (спирти, ефіри, ацетон, бензол тощо) не можна визначати речовину за запахом, щоб уникнути отруєнням їх парами;
- ✓ наповнення піпеток розчинами органічних розчинників, кислот, лугів проводять тільки за допомогою груші;
- ✓ уважно стежити за тим, щоб реактиви (особливо кислоти і луги) не потрапляли на обличчя, руки та одяг;
- ✓ не ходити по лабораторії з концентрованими кислотами, а наливати їх тільки в певному, відведеному для цього місці;

- ✓ не забруднювати реактиви під час роботи: не плутати пробки від склянок, які містять різні реактиви; надлишок взятого реактиву не виливати назад у посуд; набирати кожен реактив тільки призначеною для нього піпеткою і в жодному разі не плутати їх;
- ✓ у випадку потрапляння на шкіру концентрованої кислоти, уражене місце необхідно промити великою кількістю води, а потім розведеним розчином соди;
- ✓ при потраплянні розчинів лугів на шкіру уражене місце потрібно обробити спочатку розведеною кислотою, а потім водою.

### ***Правила роботи з нагрівальними приладами***

- ✓ перед тим як запалити спиртівку – переконатися, що поблизу немає легкозаймистих рідин (спирт, ефір тощо);
- ✓ запалювати спиртівку можна тільки сірником;
- ✓ у пробірці можна нагрівати лише невелику кількість розчину, рідина повинна займати не більше 1/3 об'єму пробірки;
- ✓ пробірку при нагріванні необхідно направляти в сторону від себе і людей, які знаходяться поруч;
- ✓ не можна нахилитися над спиртівкою: спочатку пробірку з розчином потрібно прогріти всю, а потім нагрівати в потрібному місці, не виймаючи з полум'я спиртівки;
- ✓ не можна нагрівати пробку довго в одному місці, оскільки рідина швидко закипить і вихлюпнеться із пробірки;
- ✓ нагрівати пробірку потрібно нижче рівня рідини в ній;
- ✓ при нагріванні рідини не можна торкатися колбою палаючого гніту, завжди дотримуватися правил безпеки при нагріванні, не допускати випліскування рідин (час від часу відводити пробірку від плум'я, не нагрівати її у вертикальному положенні);
- ✓ після нагрівання слід відразу загасити спиртівку, накривши полум'я ковпачком;

- ✓ робота з водяною банею здійснюється тільки під тягою;
- ✓ при опіках на обпечене місце портібно покласти вату, змочену розчином перманганату калію.

### ***Правила роботи з лабораторним обладнанням***

#### Центрифуги

- ✓ перед центрифугуванням центрифужні пробірки врівноважують та розміщують у центрифугу симетрично;
- ✓ центрифужна камера повинна бути закрита кришкою
- ✓ під час роботи центрифуги забороняється відкривати кришку камери;
- ✓ після відключення центрифуги необхідно дати можливість ротору зупинитися, забороняється гальмувати ротор рукою.

#### Автоматичні піпетки

- ✓ тримаючи піпетку у вертикальному положенні натиснути кнопку до першого упору (фаза А);
- ✓ занурити наконечник в рідину на глибину 3 до 5 мм (фаза С);
- ✓ доторкнутися наконечником до внутрішньої стінки посудини і спорожнити наконечник, плавно натискаючи на кнопку до першого упору з такою ж швидкістю як при взятті проби (фаза Д);
- ✓ почекати близько 1 секунди, натискаючи кнопку піпетки до другого упору, видалити залишки рідини і вийняти піпетку, ковзаючи наконечником по внутрішній стінці посудини (фаза Е);
- ✓ після зняття наконечника піпетка готова до повторення циклу роботи;
- ✓ забороняється набирати рідину піпеткою без наконечника;
- ✓ під час роботи з рідиною, що має температуру, відмінну від температури навколишнього середовища більше 5°C рекомендується багаторазово прополоскати наконечники;
- ✓ після закінчення роботи слід помістити піпетку в штативі.