



N-КАРБАМОИЛГЛУТАМАТ ПРОФИЛАКТИРУЕТ ИНТОКСИКАЦИЮ АММИАКА У ПОРОСЯТ СО СНИЖЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МАССОЙ ПЕЧЕНИ

К.С. Остренко

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии
и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства —
ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»*

249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

Конечным продуктом катаболизма белка является аммиак, который оказывает угнетающее воздействие на нейроны. Обезвреживание аммиака у млекопитающих происходит в орнитинном цикле, регуляция активности которого в основном осуществляется на уровне синтеза N-карбамоилфосфата. Цикл Кребса сопряжён с орнитинным циклом через общий субстрат — аргининсукцинат, поэтому эффекты нейтрализации аммиака, процессы аминокислотного и энергетического обмена в значительной степени взаимосвязаны. Цель данного исследования — оценить эффективность применения добавки N-карбамоилглутамата для оптимизации обменных процессов и повышения нейтрализации аммиака у поросят-сосунов. Опыт проведён на двух группах поросят (n=15), сформированных в суточном возрасте. Водный раствор препарата выпаивали опытной группе в дозе 10 мг/кг массы тела однократно ежедневно. Продолжительность скармливания добавки — 30 сут, среднесуточный прирост живой массы определяли при отъёме в возрасте 30 сут. Анализ биохимического состава крови проведён на 30-е сут от начала опыта. По окончании скармливания добавки в опытной группе выявлено снижение содержания аммиака ($p<0,05$) и мочевины в плазме крови, увеличение концентрации аргинина ($p<0,05$) и триацилглицеролов ($p<0,05$) в сравнении с контрольной группой. Заключение, что применение добавки N-карбамоилглутамата способствует эндогенной продукции незаменимой аминокислоты аргинина, нейтрализации аммиака, образующегося в метаболических процессах, а также экономии затрат метаболической энергии на связывание аммиака в цикле мочевинообразования.

Ключевые слова: поросята-сосуны, кормовые добавки, N-карбамоилглутамат, нейтрализация аммиака, эндогенный синтез аргинина

Конфликт интересов: автор заявил об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Остренко К.С. N-карбамоилглутамат профилактирует интоксикацию аммиака у поросят со сниженной функциональной массой печени. *Биомедицина*. 2024;20(3):94–99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-94-99>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.09.2024

N-CARBAMOYL GLUTAMATE PREVENTS AMMONIA INTOXICATION IN PIGLETS WITH REDUCED LIVER FUNCTION

Konstantin S. Ostrenko

All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute
of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village

Ammonia as the end product of protein catabolism has a depressing effect on neurons. Ammonia neutralization in mammals occurs in the ornithine cycle, the activity of which is regulated mainly at the level of synthesis of N-Carbamoyl phosphate. The Krebs cycle is coupled with the ornithine cycle through a common substrate—arginine succinate. Therefore, the effects of ammonia neutralization and the processes of amino acid and energy metabolism are largely interrelated. This study is aimed at evaluating the efficacy of an N-carbamoyl glutamate additive in terms of optimizing metabolic processes and improving ammonia neutralization in suckling piglets. The experiment was conducted on two groups of piglets (n=15) formed at the age of 24 hours. Piglets in the experimental group were fed with an aqueous solution of the drug at a dose of 10 mg/kg of body weight once daily. The duration of feeding the supplement was 30 days; the average daily gain in body weight was determined at weaning at the age of 30 days. An analysis of the blood biochemical composition was carried out on the 30th day from the onset of the experiment. At the end of feeding the supplement in the experimental group, a decrease in the content of ammonia (p<0.05) and urea in blood plasma, an increase in the concentration of arginine (p<0.05) and triacylglycerols (p<0.05) in comparison with the control group was revealed. The N-carbamoyl glutamate additive under study stimulates the endogenous production of the arginine essential amino acid, neutralizes ammonia formed in metabolic processes, and optimizes the amount of metabolic energy spent on binding ammonia in the urea cycle.

Keywords: suckling pigs, feed additives, N-Carbamoyl glutamate, ammonia neutralization, endogenous arginine synthesis

Conflict of interest: the author declares no conflict of interest.

For citation: Ostrenko K.S. N-Carbamoyl Glutamate Prevents Ammonia Intoxication in Piglets with Reduced Liver Function. *Journal Biomed.* 2024;20(3):94–99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-3-94-99>

Submitted 10.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.09.2024

Введение

Врождённые ошибки уреагенеза представляют собой группу наследственных заболеваний, при которых имеется дефект фермента или транспортёра, влияющий на выработку или перемещение биохимических промежуточных продуктов метаболического пути, ответственного за утилизацию избыточного азота. Серьёзные медицинские проблемы могут возникнуть из-за чрезмерного накопления токсичных метаболитов, таких как аммиак или другие соединения. Детоксикация аммиака посредством цикла мочевины в перипортальных гепатоцитах является основным путём утилизации азота в виде мочевины, которая выводится с мочой [5]. В утилизации

азота через цикл мочевины участвуют семь ферментов, включая карбоангидразу VA (CAVA), N-ацетилглутаматсинтазу (NAGS), карбамоилфосфатсинтазу 1 (CPS1) и орнитинтранскарбамилазу (ОТС), аргининосукцинатсинтазу (ASS), аргининосукцинатлиазу и аргиназу. Дефицит любого из этих ферментов или транспортёров, кодируемых *SLC25A13* или *SLC25A15*, приводит к нарушению цикла мочевины. Нарушение цикла мочевины (НЦМ) может привести к гипераммониемии, приводящей к энцефалопатии, судорогам, коме и смерти. Гипераммониемия является одним из наиболее значимых и опасных для жизни последствий метаболической декомпенсации у пациентов, особенно в раннем постна-

тальном онтогенезе, но она может возникать и у пациентов с другими врождёнными нарушениями обмена веществ вследствие вторичного угнетения цикла мочевины и дефицита субстрата. В результате вторичной дисфункции цикла мочевины значительная гипераммониемия может наблюдаться при органических ацидемиях, дефектах окисления жирных кислот, нарушениях обмена аминокислот и токсичности вальпроевой кислоты. Надлежащий контроль аммиака является важной частью медицинского лечения (НЦМ), и за последние десятилетия были вложены значительные усилия в разработку новых методов лечения. У новорождённых с недостаточной массой тела риск развития гипераммониемии возрастает в связи с недостаточно развитой печенью как по массе, так и по функциональной активности.

Первый случай дефицита НМЦ был описан в 1981 г. у младенца мужского пола из Швейцарии, в семейном анамнезе которого была младенческая смертность его братьев и сестёр от гипераммониемии. Биохимический профиль этого пациента предполагал блокаду цикла мочевины проксимальнее ОТС, и диагноз был подтверждён неопределяемой активностью фермента NAGS в ткани печени при биопсии, в то время как активность CPS1 была интактной [4]. Впоследствии у новорождённого был выявлен ещё один случай дефицита НМЦ с аналогичной летальной картиной [3]. С тех пор во всём мире было зарегистрировано более 50 пациентов [6, 13]. Интересно, что клинические симптомы дефицита NAGS разнообразны: от раздражительности, рвоты и вялости до поведенческих нарушений. Как правило, у пациентов с тяжёлой формой заболевания в неонатальном периоде появляются симптомы гипераммониемической энцефалопатии, тогда как более лёгкие случаи проявляются во взрослом возрасте нейropsychиатрическими или поведенческими симптомами [6]. Недавнее

когортное и биохимическое исследование выявило, что мутации в домене ацетилтрансферазы (GNAT) встречаются чаще, чем в другом домене кинетической аминокислотной киназы [13]. Кроме того, мутации, затрагивающие домен GNAT, более вредны и вызывают тяжёлую неонатальную форму [13]. Из-за редкости распространённость этого расстройства неясна, но распределение случаев является панэтническим [1, 6]. Истинная частота заболевания, вероятно, недооценена по разным причинам: скрининг новорождённых с помощью tandemной масс-спектрометрии не выявляет дефицит НМЦ, люди с лёгким поражением могут годами не иметь симптомов, а люди с тяжёлым поражением могут умереть, не будучи диагностированы. Клиническая и биохимическая картина дефицита НМЦ может быть неотличима от дефицита CPS1, и молекулярно-генетический анализ особенно полезен для подтверждения диагноза дефицита НМЦ, заменяя ферментативный анализ в качестве предпочтительного метода подтверждения [10].

Традиционно лечение гипераммониемии у пациентов с НМЦ включает диетическое ограничение белка для уменьшения потока азота и назначение препаратов, поглощающих аммиак, таких как бензоат, фенилацетат и фенилбутират, для отвода избыточного азота в нетоксичный пул выводимых метаболитов [11, 12]. Несмотря на развитие этих терапевтических подходов, полной терапии НМЦ не существует, за исключением трансплантации печени, которая показана при более тяжёлом проксимальном дефиците CPS1, ОТС и ASS1. N-карбамоил-глутаминовая кислота (NCG), структурный аналог N-ацетилглутамата (NAG), используется для лечения дефицита NAGS с самого описания этого НМЦ [8, 9]. Непосредственно заменяя NAG, который является важным активатором фермента CPS1, без которого этот фермент неактивен [7], NCG действует как почти лечебное

лекарство при дефиците NAGS. Кроме того, учитывая его способность действовать как активатор цикла мочевины, NCG был предложен в качестве потенциальной терапии вторичной гипераммониемии, вызванной органическими ацидемиями, печёночной энцефалопатией и гипераммониемией, вызванной вальпроатом [2, 7, 14].

Цель исследования — на модели поросят-сосунов с низкими весовыми показателями при опоросе изучить физиологические эффекты NCG в контексте его влияния на орнитинный цикл и возможность использования для лечения НМЦ.

Материалы и методы

Для проведения исследования было сформировано две группы поросят по 15 гол. в каждой на 8-е сут после опороса. В качестве критерия отбора служили показатели живой массы тела, отбирались поросята с низкими индексами массы тела. Поросята опытной и контрольной группы находились в своём гнезде, но были промаркированы ушными метками. Условия содержания для групп были идентичны. Препарат N-карбамоилглутамата (NCG) растворяли в 5 мл воды и вводили в дозировке 10 мг/кг массы тела однократно ежедневно перорально в течение 30 сут. Контрольная группа получала питьевую воду в том же объёме. Водный р-р N-карбамоилглутамата (NCG) выпаивали одновременно с суточного возраста. Для оценки действия NCG на приросты массы тела определяли живую массу в начале опыта и по завершении эксперимента в возрасте 30 сут. Отбор проб крови проводили через 30 дней после введения препарата.

Для изучения действия препарата в сыворотке крови свиней на 30-е сут после опороса определяли концентрацию мочевины, креатинина, общего белка, глюкозы, триацилглицеролов, аммиака. Исследования проведены на автоматическом биохими-

ческом анализаторе ERBA XL-100 («Erba Group», Чехия). Уровень аргинина определяли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель 105М» («Люмэкс», Россия).

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы Statistica 10 («StatSoft Inc.», США). Различия между средними значениями были определены с помощью критерия Тьюки при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследование биохимического состава сыворотки крови в возрасте 30 сут по завершении применения препарата показало, что испытуемый препарат не оказывает негативного влияния на метаболические процессы и общее состояние организма поросят. Практически все исследуемые биохимические показатели крови находились в пределах физиологической нормы, но было зафиксировано статистически значимое различие групповых данных по концентрации в крови аммиака и аргинина (табл. 1).

Снижение концентрации аммиака в крови у поросят опытной группы является показателем активации фермента CPS1 (без NCG данный фермент находится в неактивной

Таблица 1. Показатели биохимического состава крови поросят-сосунов по завершению исследования ($M \pm m$; $n = 15$)

Table 1. Biochemical blood parameters of suckling piglets at the end of the study ($M \pm m$; $n = 15$)

Показатели	Группы	
	опыт	контроль
Общий белок, ммоль/л	81,40±9,59	80,60±10,26
Альбумины, ммоль/л	46,60±4,87	43,08±4,02
Глюкоза, ммоль/л	4,8±1,33	4,6±1,4
Триглицеролы, мМ	1,33±0,14*	1,05±0,16
Мочевина, ммоль/л	5,46±0,45	6,25±0,69
Аммиак, мкмоль/л	19,12±2,98*	53,66±7,60
Аргинин, мкмоль/л	20,72±0,71*	14,30±1,82
Креатинин, мкмоль/л	418,4±23,4*	355,8±36,3

Примечание: * — $p < 0,05$ по *t*-критерию при сравнении с контролем.

Note: * — $p < 0.05$ by *t*-test when compared with the control.

Таблица 2. Живая масса поросят и среднесуточный прирост живой массы ($M \pm m$; $n=12$)
Table 2. Live weight of piglets and average daily live weight gain ($M \pm m$; $n=12$)

Группы	Показатели роста			
	Живая масса до исследования, кг	Живая масса на 30-й день исследования, кг	Прирост за период исследования	Среднесуточный прирост за период исследования, г/сут.
Опыт	0,54±0,18	3,77±0,37*	3,23±0,01*	108±6*
Контроль	0,56±0,29	2,85±0,43	2,29±0,02	76±14

Примечание: * — $p < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

Note: * — $p < 0.05$ by t -test when compared with the control.

форме), восстановления активности орнитинового цикла, повышения активности белоксинтезирующей системы.

Основываясь на данных показателях, полученных в эксперименте, можно утверждать, что применение N-карбамоилглутамата (NCG) активизирует карбамоилфосфатсинтетазу, что приводит к повышению продукции карбамоилфосфата, который, помимо активизации мочевинообразования и продукции аргинина, участвует и в синтезе креатина, фосфорилированная форма которого обладает высоким запасом свободной энергии.

Данные показатели свидетельствуют, что карбамоилфосфат способствует не только удалению конечного токсичного продукта метаболизма азотосодержащих веществ аммиака, но в определённых метаболических ситуациях он будет направлен на синтез высокоэнергетического вещества креатинфосфата с использованием его в процессах синтеза, а именно обеспечение их энергией. Наиболее активно этот процесс протекает в скелетных мышцах. В связи с этим можно говорить о повышении фосфорилированной формы креатина, как активирующем процессе снижения аммиака не только через мочевинообразование, но и по пути синтеза белоксодержащих веществ, что подтверждается достоверным увеличением концентрации креатинина в крови у поросят опытных групп относительно поросят контрольной группы на 17,6%. Активация орнитинового цикла на уровне карбамоилфосфата способствует существенному снижению уровня аммиака, т. е. лучшей утилизации азота корма.

Повышение концентрации аргинина в опытной группе указывает на активизацию продукции эндогенного аргинина и тем самым — на лучшее обеспечение белкового синтеза этой незаменимой аминокислотой, а также на снижение затрат энергии на мочевинообразование при нейтрализации аммиака.

Определённая часть продукции мочевины была обусловлена связыванием аммиака, поэтому сэкономленная метаболическая энергия в условиях опыта была использована для синтеза белка, что подтверждается достоверным повышением прироста у поросят опытных групп на 32,8% по сравнению с контролем. В опытной группе также достоверно за период исследования повысился среднесуточный прирост на 42%. Данные приведены в табл. 2.

Применение препарата карбамоилглутамата способствует увеличению эндогенной продукции аргинина, нейтрализации аммиака, образующегося в метаболических процессах, а также экономии затрат метаболической энергии на связывание аммиака в цикле мочевинообразования и способствует интенсификации набора живой массы тела у поросят-сосунов.

Закключение

В ходе проведённых исследований было установлено значительное достоверное снижение аммиака в плазме крови поросят опытной группы, что свидетельствует не только о снижении его синтеза, но и о повышенном его использовании как источника небелкового азота, что подтверждается

достоверным повышением концентрации аргинина и креатинина в крови поросят опытных групп относительно контроля и достоверным увеличением приростов живой массы у поросят опытной группы. Применение препарата карбамоилфосфата у поросят способствует активизации орни-

тинового цикла, увеличению эндогенной продукции незаменимой аминокислоты аргинина, нейтрализации аммиака, образующегося в метаболических процессах, а также экономии затрат метаболической энергии на связывание аммиака в цикле мочевинообразования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ah Mew N., Caldovic L. N-acetylglutamate synthase deficiency: An insight into the genetics, epidemiology, pathophysiology, and treatment. *Appl. Clin. Genet.* 2011;4:127–135. DOI: 10.2147/TACG.S12702
2. Ah Mew N., Payan I., Daikhin Y. Effects of a single dose of N-carbamylglutamate on the rate of ureagenesis. *Mol. Genet. Metab.* 2009;98(4):325–330. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.07.010
3. Bachmann C., Brandis M., Weissenbarth-Riedel E., Burghard R., Colombo J.P. N-acetylglutamate synthetase deficiency, a second patient. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1988;11(2):191–193. DOI: 10.1007/BF01799871
4. Bachmann C., Krähenbühl S., Colombo J.P., Schubiger G., Jaggi K.H., Tönz O. N-acetylglutamate synthetase deficiency: A disorder of ammonia detoxication. First report of NAGS deficiency patient. *N. Engl. J. Med.* 1981;304(9):543. DOI: 10.1056/NEJM198102263040918
5. Brusilow S.W., Horwich A.L. Urea cycle enzymes. In: Valle D.L., Antonarakis S., Ballabio A., Beaudet A.L., Mitchell G.A. (eds). *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill Education, 2019. DOI: 10.1036/ommbid.395
6. Cartagena A., Prasad A.N., Rupar C.A., Strong M., Tuchman M., Ah Mew N., Prasad C. Recurrent encephalopathy: NAGS (N-acetylglutamate synthase) deficiency in adults. *Can. J. Neurol. Sci.* 2013;40(1):3–9. DOI: 10.1017/s0317167100012877
7. Daniotti M., La Marca G., Fiorini P., Filippi L. New developments in the treatment of hyperammonemia: Emerging use of carginic acid. *Int. J. Gen. Med.* 2011;4:21–28. DOI: 10.2147/IJGM.S10490
8. 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;5:16950. DOI: 10.1038/srep16950
9. Häberle J., Schmidt E., Pauli S., Kreuder J.G., Plecko B., Galler A., Wermuth B., Harms E., Koch H.G. Mutation analysis in patients with N-acetylglutamate synthase deficiency. *Hum. Mutat.* 2003;21(6):593–597. DOI: 10.1002/humu.10216
10. Häberle J. Role of carginic acid in the treatment of acute hyperammonemia due to N-acetylglutamate synthase deficiency. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2011;7:327–332. DOI: 10.2147/TCRM.S12703
11. Matoori S., Leroux J.C. Recent advances in the treatment of hyperammonemia. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;90:55–68. DOI: 10.1016/j.addr.2015.04.009
12. Oishi K., Diaz G.A. Glycerol phenylbutyrate for the chronic management of urea cycle disorders. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 2014;9(5):427–434. DOI: 10.1586/17446651.2014.945908
13. Sancho-Vaello E., Marco-Marin C., Gougeard N., Fernández-Murga L., Rüfenacht V., Mustedanagic M., Rubio V., Häberle J. Understanding N-acetyl-L-glutamate synthase deficiency: Mutational spectrum, impact of clinical mutations on enzyme functionality, and structural considerations. Most recent comprehensive report of clinical mutation in patients with NAGS deficiency. *Hum. Mutat.* 2016;37(7):679–694. DOI: 10.1002/humu.22995
14. Tuchman M., Caldovic L., Daikhin Y., Horyn O., Nissim I., Nissim I., Korson M., Burton B., Yudkoff M. N-carbamylglutamate markedly enhances ureagenesis in N-acetylglutamate deficiency and propionic acidemia as measured by isotopic incorporation and blood biomarkers. *Pediatr Res.* 2008;64(2):213–217. DOI: 10.1203/PDR.0b013e318179454b

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Остренко Константин Сергеевич, д.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»; e-mail: Ostrenkoks@gmail.com

Konstantin S. Ostrenko, Dr. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst; e-mail: Ostrenkoks@gmail.com