

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЮРІЯ
ФЕДЬКОВИЧА

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У
МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ ТВАРИН З АЦЕТАМІНОФЕН-
ІНДУКОВАНОЮ ТОКСИЧНІСТЮ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ
ЕТАНОЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ *HERICIUM ALPESTRE*

Дипломна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 А група

Вікол Надія Владиславівна

Керівник:

кандидат біологічних наук

доцент **Волощук О.М.**

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № ____ від _____ 2025 р.

Зав. кафедрою _____ доц. Волощук О.М.

Чернівці – 2025

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню інтенсивності вільнорадикальних процесів у мітохондріях печінки тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*.

Встановлено, що у тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю інтенсивність генерації супероксид аніон-радикала збільшується майже у 2,5 рази, а гідроксильного радикала – у 1,7 рази порівняно з тваринами контрольної групи, при цьому спостерігається накопичення продуктів вільнорадикального ушкодження ліпідів і протеїнів. Показано, що попереднє введення екстракту протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг маси тіла перед моделюванням токсичного ураження ацетамінофеном призводить до зниження швидкості генерації супероксиду проте досліджуваний показник не повертається до значень контролю, на відміну від гідроксильного радикала, значення якого наближаються до контрольних. Окрім того, у тварин цієї групи спостерігається достовірне зменшення вмісту ТБК-активних продуктів і карбонільних похідних. При цьому найбільш виражене зниження інтенсивності вільнорадикальних процесів спостерігається у групі тварин, яким вводили екстракт протягом 7 днів у дозі 500 мг/кг маси тіла після токсичного моделювання. Отримані результати свідчать, що етанольний екстракт *Hericium alpestre* виявляє антиоксидантну активність та зменшує прояви оксидативного ушкодження основних макромолекул клітин печінки за умов передозування ацетамінофеном.

Ключові слова: печінка, ацетамінофен, *Hericium alpestre*, активні форми кисню, ТБК-активні продукти, карбонільні похідні.

ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to the study of the intensity of free radical processes in the liver mitochondria of animals with acetaminophen-induced toxicity under the conditions of administration of ethanol extract of *Hericium alpestre*.

It was found that in animals with acetaminophen-induced toxicity, the intensity of generation of superoxide anion radical increases by almost 2,5 times, and hydroxyl radical - by 1,7 times compared to animals of the control group, while the accumulation of products of free radical damage to lipids and proteins is observed. It is shown that the preliminary administration of the extract for 10 days at a dose of 200 mg/kg of body weight before modeling toxic damage with acetaminophen leads to a decrease in the rate of superoxide generation, however, the studied indicator does not return to control values, unlike the hydroxyl radical, the values of which are close to the control ones. In addition, in animals of this group, a significant decrease in the content of TBA-active products and carbonyl derivatives is observed. At the same time, the most pronounced decrease in the intensity of free radical processes is observed in the group of animals that were administered the extract for 7 days at a dose of 500 mg/kg body weight after toxic modeling. The results obtained indicate that the ethanol extract of *Hericium alpestre* exhibits antioxidant activity and reduces the manifestations of oxidative damage to the main macromolecules of liver cells under conditions of acetaminophen overdose.

Keywords: liver, acetaminophen, *Hericium alpestre*, reactive oxygen species, TBA-active products, carbonyl derivatives.

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

Н.В.Вікол

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1. Механізми токсичності ацетамінофену.....	7
2. Загальна характеристика активних форм кисню.....	8
3. Маркери оксидативного стресу.....	12
3.1. ТБК-активні продукти як маркери вільнорадикальних процесів.....	13
3.2. Карбонільні похідні як маркери ушкодження білків.....	15
4. Гриби як потенційне джерело антиоксидантних сполук.....	16
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	20
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ ..	24
ВИСНОВКИ	29
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	30
ДОДАТКИ	36

ВСТУП

На сьогоднішній день захворювання печінки, спричинені гепатотоксичними речовинами, зокрема ацетамінофеном, є важливою медичною проблемою через їхню поширеність та потенційні летальні наслідки. Ацетамінофен широко використовується як анальгетик та жарознижувальний засіб, однак його передозування спричиняє гостре токсичне ураження печінки. Механізм гепатотоксичної дії ацетамінофену пов'язаний з утворенням реактивного метаболіту N-ацетил-*p*-бензохіноніміну. Його накопичення призводить до оксидативного стресу, що є ключовою ланкою у патогенезі багатьох захворювань людини, зокрема і пошкодження печінки. Оксидативний стрес – це стан дисбалансу між генерацією активних форм кисню та антиоксидантів, які здатні їх нейтралізувати [1].

У зв'язку з цим актуальним є пошук нових сполук з антиоксидантною активністю, які потенційно можуть проявляти гепатопротекторну дію. В останні роки все більше досліджень присвячені вивченню екстрактів грибів як джерел антиоксидантів з вираженим гепатопротекторним потенціалом. Наявність антиоксидантних сполук у грибах дозволяє їм ефективно поглинати вільні радикали, пригнічувати пероксидне окиснення ліпідів і хелатувати іони [2]. Зокрема, значну увагу науковців привернули гриби роду *Hericium*. Екстракти цих грибів багаті на різні біологічно активні речовини та нутрієнти, а також демонструють протизапальну, антимікробну, протидіабетичну, антиоксидантну та протипухлинну дії, ймовірно зумовлену наявністю полісахаридів, геріценонів, еринацинів і фенольних сполук [3]. Проте *Hericium alpestre* залишається практично не вивченим.

Мета роботи – дослідження інтенсивності вільнорадикальних процесів у мітохондріях печінки тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*.

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

1. Визначити швидкість генерації супероксид аніон-радикала та гідроксильного радикала в мітохондріях печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.

2. Дослідити вміст ТБК-активних продуктів як маркерів окисного ушкодження ліпідів та вміст карбонільних похідних як маркерів окисного ушкодження протеїнів у мітохондріях печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Механізм токсичності ацетамінофену

Ацетамінофен (АРАР) є одним із найпоширеніших безрецептурних лікарських засобів, який застосовується як жарознижувальний та знеболюючий препарат у всьому світі [4]. У терапевтичних дозах (до 4 г/добу для дорослих) він вважається безпечним. Проте при передозуванні ацетамінофен виявляє потужну гепатотоксичність і є основною причиною гострої печінкової недостатності в багатьох країнах, зокрема у США [5]. Гепатотоксична дія проявляється при перевищенні гранично допустимих доз. Для дорослих токсичною вважається разова доза 10 г/добу або 200 мг/кг маси тіла. Хронічне споживання навіть нижчих доз 6 г/добу або 150 мг/кг маси тіла, особливо на тлі голодування або вживання алкоголю, також може бути токсичним через зниження рівня глутатіону в печінці [6].

При споживанні в терапевтичних дозах основна частина (80-90%) АРАР метаболізується шляхом кон'югації з глюкуроновою кислотою або сульфатом і виводиться із сечею, через нирки. Проте, невелика частина метаболізується ферментами цитохрому Р450, таких як Сур2Е1 і Сур1А2, з утворенням реактивного метаболіту N-ацетил-*p*-бензохіноніміну (NAPQI). Незважаючи на високу реакційну здатність, цей метаболіт рідко є шкідливим після споживання терапевтичних доз, оскільки він швидко кон'югується з великими запасами глутатіону в печінці та виводиться через жовч. Проте при передозуванні ацетамінофену запаси глутатіону в печінці виснажуються, що сприяє накопиченню вільного NAPQI в гепатоцитах. Він ковалентно зв'язується з клітинними макромолекулами, особливо з білками мітохондрій, що ініціює каскад патологічних змін. Зокрема, порушується функція АТФ-синтази та електронтранспортного ланцюга, що призводить до надмірного утворення супероксид аніон-радикала, який реагує з оксидом азоту з утворенням пероксинітриду, який нітрує мітохондріальні білки, такі як Mn-

супероксиддисмутаза. Це порушує антиоксидантний захист мітохондрій, викликаючи мітохондріальний окиснювальний стрес, що призводить до пошкодження мітохондріальної ДНК і ранньої активації c-Jun N-термінальної кінази (JNK). Подальша транслокація активованої JNK з цитозолу до мітохондрій, у свою чергу, ще більше сприяє утворенню вільних радикалів та посиленню мітохондріального окиснювального стресу. В кінцевому підсумку це призводить до відкриття пори мітохондріальної проникності (MPTP). В результаті відкриття MPTP відбувається втрата мембранного потенціалу, порушення синтезу АТФ, вивільнення цитохрому c, апоптоз-індукуючого фактора (AIF) та ендонуклеази G. Ці молекули транслокуються в ядро, індукуючи фрагментацію ДНК та некроз клітини. Пошкоджені гепатоцити вивільняють клітинний вміст, включаючи DAMPs (damage-associated molecular patterns). Ці молекули взаємодіють з Toll-подібними рецепторами імунних клітин, запускаючи стерильну запальну відповідь у печінці. На тлі гострого ушкодження активуються процеси клітинної репарації та регенерації, які частково компенсують втрати тканини, але за значного обсягу некрозу можуть бути недостатніми [7].

2. Загальна характеристика активних форм кисню

Активні форми кисню (АФК) – це високоактивні метаболіти кисню, що утворюються в живих організмах як побічний продукт аеробної діяльності. АФК є збірним терміном для вільних радикалів і нерадикалів на основі кисню, що утворюються в різних органелах [8]. У літературних джерелах вільні радикали описують як: «будь-які молекули, здатні до незалежного існування, які містять один або більше неспарених електронів» [9]. Основним джерелом активних форм кисню в клітині є мітохондрії, де вони утворюються як побічний продукт процесу окисного фосфорилування. У живих організмах в аеробних умовах приблизно 90% молекулярного кисню (O_2) відновлюється до води цитохромоксидазою в

електронтранспортному ланцюзі шляхом приєднання чотирьох електронів і чотирьох протонів, майже одночасно. Інші 10% кисню перетворюються до води через послідовне одноелектронне відновлення. До проміжних сполук в цьому процесі належать: супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водню (H_2O_2) та гідроксильний радикал (HO^{\cdot}). Схема відновлення молекулярного кисню представлена на рисунку 1.1 [10]. Слід зазначити, що з групи частково відновлених форм кисню тільки $O_2^{\cdot-}$ та HO^{\cdot} є вільними радикалами, тоді як H_2O_2 не є вільним радикалом. Однак, вони всі характеризуються вищою реакційною здатністю, ніж молекулярний кисень, тому їх об'єднують спільною назвою активні форми кисню [11].

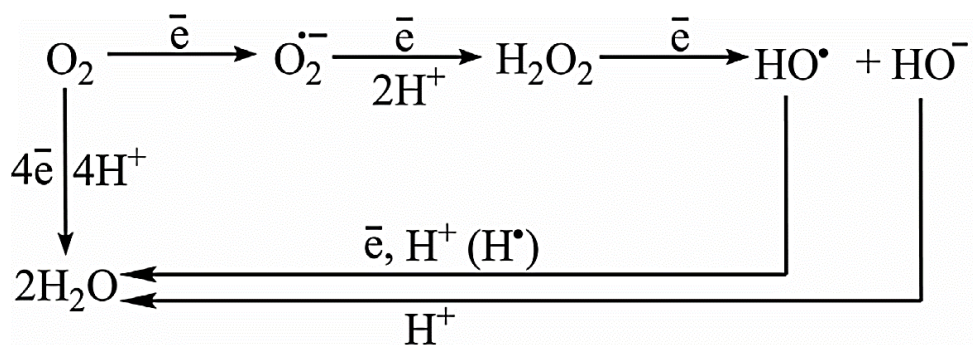


Рис. 1.1. Схема відновлення молекулярного кисню [10].

Супероксид аніон-радикал – це відновлена форма молекулярного кисню, що складається з двох атомів кисню з 17 електронами та негативним електричним зарядом. Супероксид утворюється в усіх живих аеробних організмах і може діяти як сигнальний агент, токсичний вид або нешкідливий проміжний продукт, який спонтанно розкладається. Біологічно $O_2^{\cdot-}$ може утворюватися декількома шляхами. Зокрема, в мітохондріальному електронтранспортному ланцюзі, який є його основним джерелом утворення, а також у ферментативних реакціях за участі НАДФН-оксидази, ксантинооксидази, ліпоксигенази, циклооксигенази та цитохром P450 редуктази [12].

НАДФН-оксидаза – це фермент, який каталізує перенесення електронів через біологічні мембрани, утворюючи радикальний супероксид-аніон з кисню,

окислюючи НАДФН під час цього процесу. Завдяки цій функції НАДФН-оксидаза бере участь у багатьох фізіологічних функціях, таких як захист організму та запалення, клітинна передача сигналів, опосередкована АФК експресія генів, клітинна смерть і старіння.

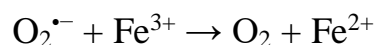
Ксантинооксидаза існує у вигляді двох взаємоперетворюваних формах ксантиндегідрогенази та ксантинооксидази. Ксантинооксидаза належить до родини молібден-флавоферментів і вивільняється протеазою, що активується кальцієм, під час гіпоксії. Вона унікальна тим, що утворює супероксид (28%) і пероксид водню (72%) в процесі катаболізму пуринів, шляхом окиснення гіпоксантину до ксантину та ксантину до сечової кислоти. Її активність підвищується при запальних захворюваннях дихальних шляхів, ішемічному реперфузійному пошкодженні, атеросклерозі, діабеті та аутоімунних захворюваннях [13].

Ліпооксигеназа та циклооксигеназа також генерують АФК під час синтезу лейкотрієнів, тромбоксанів і простагландинів. Фермент цитохром P450 редуктаза перетворює молекулярний кисень у супероксид або як основний продукт, або як побічний продукт під час окиснення різноманітних сполук [14].

Існує багато джерел утворення супероксид аніон-радикала. Оскільки ця молекула є високоактивною, її надмірне утворення може призвести до порушення фізіологічних окисно-відновних функцій. Для того, щоб запобігти накопиченню активних форм кисню аеробні організми розробили декілька стратегій для їх детоксикації. Першою лінією захисту є дисмутація супероксиду в пероксид водню за допомогою фермента супероксиддисмутази. В реакції одна молекула $O_2^{\cdot-}$ окиснюється до молекулярного кисню, а інша відновлюється до пероксиду водню [14]. Утворений H_2O_2 може перетворюватись у HO^{\cdot} в реакції Фентона. Він взаємодіє з іонами двовалентного заліза з утворенням гідроксильного радикалу, гідроксид-іону та іону тривалентного заліза. Ця реакція представлена наступним рівнянням:



Ще одним шляхом утворення гідроксильного радикалу є реакція Хабера-Вейса. У першій реакції відбувається відновлення заліза:



Другий крок – реакція Фентона:



Ця реакція вважається термодинамічно можливою, однак у біологічних умовах вона потребує каталізу іонами металів, зокрема Fe^{2+} або Cu^+ . Таким чином, фактично реакція Хабера-Вейса включає в себе реакцію Фентона [15].

Утворений гідроксильний радикал вважається найреактивнішим серед усіх активних форм кисню, що зустрічаються в живих організмах. Його надзвичайна реактивність пояснюється наявністю неспареного електрона. Він має дуже короткий період напіврозпаду і тому реагує з молекулами в місці свого утворення. Швидкість реакції з іншими молекулами становить приблизно 10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1}\times\text{s}^{-1}$. Його взаємодія з ДНК, білками та ліпідами призводить до пошкодження цих молекул. Наприклад, при взаємодії з гуаніном у ДНК, утворюється 8-гідроксигуанін – мутагенний продукт. Він також може викликати розриви ланцюгів ДНК та модифікації основ. У білках окиснює метіонін до метіонінсульфоксиду та може викликати розрив пептидного ланцюга. У ліпідах ініціює пероксидне окиснення, утворюючи вільні радикали, які запускають ланцюгові реакції з утворенням токсичних альдегідів, таких як малоновий діальдегід і 4-гідрокси-2-ноненаль, що пошкоджують клітинні мембрани [16].

Через виняткову реактивність гідроксильного радикалу, в організмі не існує ферментативної системи, здатної його безпосередньо нейтралізувати. Натомість в клітинах є механізми, що спрямовані на запобігання його утворенню. Зокрема, ендogenous антиоксидантні ферменти, такі як каталаза, глутатіонпероксидаза та пероксидаза, забезпечують ефективне розщеплення H_2O_2 до води і кисню. Білки-зв'язувачі металів – трансферин, феритин, лактоферин – виконують функцію хелаторів іонів Fe^{2+} та Cu^+ , обмежуючи їх

доступність для реакцій з пероксидом водню. Важливу роль відіграють і екзогенні антиоксиданти, такі як флавоноїди. Це природні поліфенольні сполуки рослинного походження. Вони не лише безпосередньо знешкоджують HO^{\bullet} , але й здатні хелатувати іони металів, блокуючи його утворення за реакцією Фентона [16].

Активні форми кисню виконують подвійну роль в організмі. З одного боку, вони беруть участь у регуляції внутрішньоклітинних сигнальних шляхів; нейтрофіли і макрофаги використовують їх для знищення патогенних мікроорганізмів, що сприяє захисту організму від інфекцій; регулюють процеси клітинної проліферації, диференціації та апоптозу. З іншого боку, надмірне утворення АФК може спричинити окиснювальний стрес, у результаті чого клітини не зможуть підтримувати нормальні фізіологічні окисно-відновні функції [17].

3. Маркери оксидативного стресу

Надмірне виробництво активних форм кисню та утворення вільних радикалів можуть призвести до оксидативного стресу, який може спричиняти пошкодження клітин, тканин та органів. Клітинний окиснювальний стрес визначається як дисбаланс між виробництвом прооксидантів і антиоксидантів. Цей дисбаланс може призвести до неправильної роботи або зміни структури основних клітинних молекул, таких як ліпіди, білки та ДНК [18]. Оксидативний стрес був описаний як один з патофізіологічних механізмів різних захворювань, таких як серцево-судинні захворювання, рак, атеросклероз, діабет, артрит, нейродегенеративні розлади та захворювання легенів, нирок і печінки. Через це протягом останніх десятиліть було проведено багато досліджень з опису та підтвердження різних біомаркерів окиснювального стресу, за допомогою яких можна оцінювати біологічний окисно-відновний баланс, стан і прогресування

захворювань, а також оцінити ефективність використання антиоксидантів у терапевтичних цілях [19].

3.1. ТБК-активні продукти як маркери вільнорадикального ушкодження ліпідів

Оцінка рівня ТБК-активних продуктів широко використовується як маркер інтенсивності вільнорадикальних процесів. Підвищення їх концентрації розглядається як індикатор порушення окисно-відновного гомеостазу в клітинах і тканинах [20]. ТБК-активні продукти є комплексною групою сполук, що утворюються внаслідок реакції тіобарбітурової кислоти з продуктами пероксидного окиснення ліпідів. Серед широкого спектру ТБК-активних речовин малоновий діальдегід є найбільш дослідженим і найчастіше використовується у якості біомаркера. Це обумовлено тим, що він утворюється в значній кількості в процесі пероксидного окиснення поліненасичених жирних кислот, зокрема арахідонової кислоти, є досить стабільною сполукою та має високу реактивність, що дозволяє йому вступати в реакції з білками і нуклеїновими кислотами [21].

Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) часто відбувається у відповідь на окислювальний стрес, при якому активні форми кисню викликають окиснення ліпідів, що містять подвійні вуглець-вуглецеві зв'язки в біліпідних шарах мембрани. Продуктами ПОЛ є ненасичені альдегіди (4-гідрокси-2-ноненал і акролеїн), діальдегіди (малоновий діальдегід і гліюксаль) і кетоальдегіди (4-оксо-2-ноненал і ізокетали). Деякі з них мають високу реакційну здатність і розглядаються як вторинні токсичні месенджери, які поширюють і збільшують окисне пошкодження. Найпоширенішими альдегідами на даний момент є 4-гідроксиноненал і малоновий діальдегід. Перший має найвищу біологічну активність, а другий у великій кількості виробляється під час ПОЛ [22].

Пероксидне окиснення ліпідів можна поділити на три основні фази: ініціація, поширення та термінація. На першій стадії активні форми кисню,

зокрема HO^\bullet або $\text{O}_2^{\bullet-}$, атакують поліненасичені жирні кислоти, що призводить до утворення первинних ліпідних радикалів. У фазі поширення ліпідний радикал реагує з молекулярним киснем, формуючи пероксильний радикал, який може атакувати інші молекули ліпідів, сприяючи розповсюдженню ланцюгової реакції. У стадії термінації гідропероксиди ліпідів піддаються деградації з утворенням вторинних продуктів окиснення, серед яких малоновий діальдегід [23].

З хімічної точки зору, малоновий діальдегід має високу реактивність, що дозволяє йому утворювати ковалентні аддукти з білками, ліпідами та нуклеїновими кислотами. Ці аддукти можуть змінювати структуру та функціональну активність біомолекул, що призводить до порушення клітинного гомеостазу. Зокрема, малоновий діальдегід може ковалентно взаємодіяти з білками та нуклеїновими кислотами, що призводить до утворення зшивок ДНК-білок та різних аддуктів, що пошкоджують біомолекули [24]. Він також має здатність діяти як вторинний токсичний месенджер, що модулює клітинні сигнальні шляхи. Залучення до регуляції клітинної активності свідчить про його участь не лише в ушкодженні біомолекул, але й у розвитку хронічних патологічних станів. Підвищений рівень малонового діальдегіда спостерігається при алкогольних та неалкогольних ураженнях печінки, цирозі, серцево-судинних захворюваннях, діабеті, нейродегенеративних розладах [20]. Оцінка його рівня найчастіше проводиться за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою. Цей метод дозволяє швидко та відносно просто визначати його рівень у біологічних зразках. Однак слід враховувати, що реакція є неспецифічною і також може виявляти інші альдегідні сполуки, що зумовлює певні обмеження в інтерпретації результатів. Для підвищення специфічності визначення малонового діальдегіда іноді застосовують методи високоефективної рідинної хроматографії або газової хроматографії-мас-спектрометрії [21].

3.2. Карбонільні похідні як маркери ушкодження білків

Вміст карбонільних похідних (карбонільних дериватів) білків є найзагальнішим і найширше використовуваним біомаркером окисного пошкодження білків. Карбонілювання білків визначається як незворотна посттрансляційна модифікація, що характеризується утворенням реактивних карбонільних груп (альдегідів і кетонів) на бічних ланцюгах амінокислот, що робить цю модифікацію найпоширенішою ознакою окисдативного пошкодження білків та важливим маркером для діагностики та прогнозування багатьох захворювань. Оцінка рівня карбонільних похідних білків має критичне значення для розуміння патогенезу та прогресування хвороб, пов'язаних з окисдативним стресом [25].

З біохімічної точки зору існує декілька механізмів утворення карбонільних дериватів. Основним є пряме окислення бічних ланцюгів амінокислот, переважно проліну, аргініну, лізину та треоніну, яке каталізується металами перехідної валентності, такими як Fe^{2+} або Cu^{2+} . Цей процес відбувається за механізмом реакції Фентона, коли іони металів взаємодіють з H_2O_2 , утворюючи високореактивні гідроксильні радикали, які атакують сусідні амінокислотні залишки [26]. При окисленні проліну і аргініну утворюються глютамінові напівальдегіди. Окислення лізину призводить до утворення аміноадипінових напівальдегідів, а окислення треоніну дає 2-аміно-3-кетомасляну кислоту [27]. Іншим механізмом є вільнорадикальне розщеплення пептидного ланцюга, яке призводить до утворення фрагментів, що містять альдегід [28]. Вторинне карбонілювання виникає внаслідок взаємодії з продуктами ПОЛ, зокрема з 4-гідрокси-2-ноненалом та малоновим діальдегідом. Ці реактивні альдегіди здатні ковалентно приєднуватися до нуклеофільних груп лізину, цистеїну та гістидину з утворенням основ Шиффа або аддуктів Міхаеля. Карбонілювання білків також може відбуватися шляхом глікоксидування. Глікація (реакція відновлюючих моносахаридів, таких як глюкоза або фруктоза, з бічними ланцюгами залишків

лізину та аргініну) утворює продукти Амадори та/або Хайнса. Ці гліковані залишки можуть взаємодіяти з АФК, що призведе до утворення кінцевих продуктів глікації, які несуть карбонільовані фрагменти. Реакційноздатні α -карбоніли, що утворюються під час глікоксидування, такі як гліюксаль, метилгліюксаль та 3-дезоксиглюкозон, модифікують основні залишки лізину та аргініну, утворюючи, наприклад, піраліни та імідазолони [29].

Для визначення карбонільних похідних білків розроблено кілька методів, кожен з яких має свої переваги. Найпоширенішим є спектрофотометричний метод із використанням 2,4-динітрофенілгідразину (ДНФГ), який взаємодіє з карбонільними групами, утворюючи стабільні 2,4-динітрофенілгідразони, що мають характерний спектр поглинання з максимумом при 370 нм. Цей метод є відносно простим і дозволяє виявити загальну кількість карбонільних груп у зразку, проте має обмежену чутливість [29]. Карбонільні похідні білків використовуються як маркери оксидативного стресу з кількох причин. Вони є стабільними модифікаціями, що зберігаються протягом тривалого часу, на відміну від АФК, які мають короткий час життя та швидко трансформуються. Крім того, карбонілювання є незворотним процесом, що призводить до акумуляції модифікованих білків та їхнього поступового накопичення при патологічних станах. Підвищений рівень карбонільних дериватів спостерігається при широкому спектрі патологічних станів, включаючи нейродегенеративні захворювання, серцево-судинні захворювання, цукровий діабет, хронічні запальні процеси та при природному старінні [27].

4. Гриби як потенційне джерело антиоксидантних сполук

Гриби століттями використовувалися завдяки своїм харчовим та лікувальним властивостям. За сучасними оцінками, вони налічують щонайменше 12 000 видів у світі, і з них 2000 видів вважаються їстівними. Близько 35 видів їстівних грибів культивуються в комерційних цілях, тоді як майже 200

дикорослих видів використовуються в лікувальних цілях [30]. До п'ятірки найбільш культивованих грибів у світі входять такі роди: *Agaricus*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Flammulina* та *Auricularia*, на які припадає 85% культивованих їстівних грибів. Їстівні види є хорошим джерелом вуглеводів, головним чином хітину, який виконує роль харчових волокон. Вони є цінним джерелом білків, що містять незамінні амінокислоти, і тому їх можна вважати альтернативою продуктам тваринного походження. Гриби мають низьку калорійність (~28-35 ккал/100 г), що пов'язано з низьким вмістом жиру, проте багаті на поліненасичені жирні кислоти, зокрема лінолеву та олеїнову, які корисні для здоров'я. Їстівні гриби забезпечують значну кількість вітамінів (B1, B2, B12, C, D та E). Окрім того, вони мають низький глікемічний індекс та високий вміст манітолу, що особливо корисно для діабетиків. В них дуже низька концентрація натрію, що корисно для пацієнтів з гіпертонією, та високий вміст калію і фосфору, що є важливим ортомолекулярним аспектом. Дієтична та лікувальна цінність їстівних грибів додатково підтверджується тим фактом, що вони є джерелами численних біологічно активних речовин і проявляють протиракову, антиатеросклеротичну, гіпохолестеринемічну, гіполіпідемічну, противірусну, антимікробну, імуностимулюючу, протизапальну, антиоксидантну та омолоджувальну дію [31]. Їстівні та лікарські гриби містять кілька мікохімічних речовин з антиоксидантною активністю, такі як феноли, флавоноїди, полісахариди, вітаміни, каротиноїди, ерготіонеїн та інші. Їх антиоксидантні властивості головним чином пов'язані з наявністю фенольних сполук та полісахаридів. Серед поліфенольних груп фенольні кислоти є основними антиоксидантами, тоді як основні антиоксидантні ефекти полісахаридів приписуються β -гліканам. Ці сполуки демонструють значну активність щодо поглинання активних форм кисню, а також здатні стимулювати активність ендогенних антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза. Антиоксидантна активність поліфенолів проявляється кількома способами. Перш

за все, вони можуть віддавати електрони, тим самим нейтралізуючи АФК та захищаючи клітини від пошкодження. Фенольні сполуки також здатні хелатувати прооксидантні метали та пригнічувати ферменти, що беруть участь в утворенні вільних радикалів. Крім того, гриби містять вітаміни С і Е, які є класичними антиоксидантами, а також мінерали, такі як селен і цинк, що беруть участь у роботі ферментативних антиоксидантних систем. Вітамін С діє як відновник та ефективний поглинач вільних радикалів, а також запобігає пероксидному окисненню ліпідів у біомембранах шляхом нейтралізації пероксильних радикалів. Як антиоксидант, цинк бере участь у регуляції метаболізму глутатіону, пригніченні ферменту NADPH-оксидази та модуляції експресії металотіонеїну, а також служить кофактором для фермента супероксиддисмутази [32].

Серед грибів, що активно досліджуються, особливу увагу привертає рід *Hericium*, до якого належать такі види як *Hericium erinaceus*, *Hericium coralloides* та *Hericium alpestre*. *Hericium erinaceus* є найбільш вивченим видом. Він є сапротрофом або слабким паразитом, здебільшого зустрічається на мертвій деревині, а іноді на тріщинах живих листяних дерев. Зріле плодове тіло м'ясисте, напівсферичне та має білувате забарвлення, що поступово змінюється на жовтувате або коричневате з віком [33]. Гриби багаті на біоактивні хімічні речовини, такі як полісахариди, гериценони, еринацини, герицерини, резорциноли, стероїди, коралоцини, моно- та дитерпени, а також на необхідні поживні речовини. Ці сполуки демонструють корисну біоактивність, пов'язану з різними фізіологічними системами організму, включаючи травну, імунну та нервову системи. Було проведено широкі дослідження з виділення та ідентифікації численних біоактивних хімічних речовин, і дослідження як *in vitro*, так і *in vivo* підтвердили їхні антимікробні, антиоксидантні, імуномодулюючі, протидіабетичні, протихолестеринемічні, протиракові та нейропротекторні властивості [34]. Серед цих сполук полісахариди, зокрема β -глюкани, є одними з найбільш вивчених біоактивних сполук у *H. erinaceus*. Вони можуть

стимулювати імунну систему, активуючи макрофаги, природні кілери (NK) та Т-лімфоцити, підвищуючи здатність організму боротися з інфекціями та раковими клітинами. Іншими полісахаридами є гетерополісахариди, що складаються з глюкози, манози, галактози та арабінози. Ці сполуки продемонстрували здатність знижувати оксидативний стрес, регулювати рівень цукру в крові та покращувати кишкову мікробіоту, діючи як пребіотичні волокна. Терпеноїди – це ще один важливий клас біоактивних сполук у *H. erinaceus*, що складається з двох ключових груп: геріценонів (що містяться в плодовому тілі) та еринацинів (що містяться в міцелії). Ці сполуки відомі переважно своїми нейрорегенеративними та нейропротекторними властивостями, оскільки вони стимулюють синтез фактора росту нервів. Потужні антиоксидантні властивості *H. erinaceus* були ретельно вивчені завдяки кільком біоактивним метаболітам, включаючи геріценони, еринацини та поліфенольні сполуки (наприклад, галова, кавова, р-кумарова кислоти). Біоактивні сполуки в *H. erinaceus* поглинають АФК, зменшуючи оксидативний стрес на клітинному рівні. Його екстракти підвищують активність антиоксидантних ферментів, включаючи супероксиддисмутазу, каталазу та глутатіонпероксидазу. Також дослідження показали, що екстракти гриба запобігають ПОЛ, знижуючи рівень малонового діальдегіда, який є значним фактором у процесі старіння та розвитку серцево-судинних захворювань [35].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводились на статевозрілих білих безпородних щурах віком 3-4 місяці. Всі маніпуляції з тваринами, які здійснювались в ході експерименту, відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях», та рекомендаціям VII Національного конгресу з біоетики про «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах».

Моделювання ураження печінки здійснювали шляхом переорального введення ацетамінофену з розрахунку 1250 мг/кг маси тварин у вигляді суспензії в 2% розчині крохмального гелю 1 раз на день протягом двох діб.

Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи:

I група – інтактні тварини (К)

II група – тварини, які отримували екстракт *Hericium alpestre* протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг маси тіла (ЕГА)

III група – тварини, які отримували токсичну дозу ацетамінофену (ТУ)

IV група – тварини, які перед моделюванням токсичного ураження отримували екстракт *Hericium alpestre* протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг маси тіла (ЕГА+ТУ)

V група – тварини, які отримували екстракт *Hericium alpestre* протягом 7 днів у дозі 500 мг/кг маси тіла після токсичного ураження ацетамінофеном (ТУ+ЕГА).

Приготування етанольного екстракту плодових тіл гриба *Hericium alpestre*

Для отримання 70% етанольного екстракту змішували 5 г порошкоподібного зразка з 50 мл 70% етанолу. Суміш піддавали струшуванню при 150 об/хв за кімнатної температури впродовж доби, після чого центрифугували при 12000 об/хв протягом 15 хвилин. Супернатант фільтрували

через фільтрувальний папір Ватман із подальшим збором фільтрату. Осад, що залишився, повторно екстрагували за ідентичних умов. Отриманий екстракт концентрували за допомогою роторного випарника Labfreez RE-2000E під вакуумом за температури 40°C. Зразок зберігався в темному місці при 4 °C [36].

Для подальшого введення тваринам готували екстракти з концентрацією 200 та 500 мг/кг маси тіла.

Виділення мітохондріальної фракції

Для отримання субклітинної фракції мітохондрій печінки застосовували метод препаративного диференційного центрифугування. Всі процедури виконували у холодних умовах при температурі 0-4°C. Свіжовилучені тканини спочатку подрібнювали ножицями та переносили до гомогенізатора Поттера. Процес гомогенізації проводили в середовищі, що містило 250 мМ сахарози, 1 мМ EDTA та 10 мМ трис-НСl (рН 7,4). Після гомогенізації отриману суміш фільтрували через чотиришаровий марлевий фільтр у центрифужні пробірки. Для осадження ядер і клітинних уламків суміш центрифугували при 1000 g протягом 10 хвилин. Надосадову рідину піддавали повторному центрифугуванню при 12000 g впродовж 15 хвилин. Осад мітохондрій, який утворився внаслідок цього, двічі промивали розчином сахарози з концентрацією 250 мМ [37].

Вміст протеїну визначали за методом Лоурі [38].

Визначення швидкості генерації супероксидного радикалу

Для визначення швидкості генерації супероксидних аніон-радикалів застосовували спектрофотометричний метод. Методика ґрунтується на здатності супероксиду відновлювати нітросиній тетразолій до диформагану.

У центрифужні пробірки вносили по 0,05 мл мітохондріальної суспензії. Далі додавали по 0,05 мл фосфатного буферного розчину (рН 7,4) та 3%-го

розчину НАДН. Суміш витримували при температурі 37°C впродовж 10 хвилин. Наступним етапом було додавання 0,05 мл 0,2% розчину НСТ та інкубація за тієї ж температури протягом 5 хвилин. Після завершення у пробірки додавали 2 мл розчинника (хлороформ-диметилсульфоксид у співвідношенні 1:2) та перемішували протягом 1 хвилини. Отриману суміш центрифугували (1500 об/хв, 5 хвилин), після чого проводили фотометрію при довжині хвилі $\lambda=540$ нм [39].

Визначення швидкості генерації гідроксильного радикала

Для дослідження рівня утворення гідроксильного радикала застосовували методику за Ткаченком та співавт. [40]. У пробірки додавали 200 мкл мітохондріальної суспензії та інкубаційне середовище, що містило 20 ммоль/л дезоксирибози, 1 ммоль/л H_2O_2 та 20 ммоль/л натрій-фосфатного буфера (рН 7,4). Суміш інкубували при 37°C 30 хв, після чого додавали по 0,5 мл 1%-ї тіобарбітурової кислоти в 50 ммоль/л NaOH та 2,8%-ї трихлороцтової кислоти. Витримували проби 20 хв на киплячій водяній бані. Після цього охолоджували та вимірювали оптичну густина при довжині хвилі 532 нм.

Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Рівень ТБК-активних продуктів встановлювали шляхом взаємодії з тіобарбітуровою кислотою, яка формує забарвлений триметинний комплекс рожевого відтінку за умов підвищеної температури та кислотності середовища. Оптичну густина утвореного кольорового розчину вимірювали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 532 нм. Розраховували вміст ТБК-активних продуктів використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Вміст ТБК-активних продуктів представляли у наномолях на міліграм протеїну [41].

Визначення вмісту карбонільних похідних

Концентрацію карбонільних дериватів протеїнів визначали за рівнем утворення похідних 2,4-динітрофенілгідразону, які формуються внаслідок реакції між окисненими залишками амінокислот та 2,4-динітрофенілгідразином. Реєстрацію утворених продуктів проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 370 нм. Результати вимірювань представляли у нмоль/мг протеїну [42].

Статистичний аналіз даних

Обробку отриманих статистичних даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення *Microsoft Excel*. Для визначення статистичної достовірності відмінностей між середніми значеннями застосовували *t*-критерій Стьюдента.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що ацетамінофен є одним з найбільш вживаних препаратів в усьому світі. Він присутній у численних рецептурних та безрецептурних ліках. Однак, через широку доступність препаратів, що містять АРАР, пацієнти можуть навмисно чи ненавмисно споживати дозу, що перевищує терапевтичну. Передозування може призвести до значного ураження печінки та навіть гострої печінкової недостатності. Внаслідок метаболізму АРАР за участі цитохрому Р450 утворюється реактивний метаболіт NAPQI. При надлишковому його накопиченні відбувається виснаження глутатіону та активація механізмів окисного стресу через надмірне продукування АФК, зокрема супероксиду та гідроксильного радикала [43].

Результати проведених досліджень показали, що введення токсичних доз ацетамінофену супроводжується інтенсифікацією утворення активних форм кисню, при цьому інтенсивність генерації супероксид аніон-радикала збільшується майже у 2,5 рази, а гідроксильного радикала – у 1,7 рази порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 3.1, 3.2). Відомо, що супероксид є первинною активною формою кисню, яка утворюється внаслідок одноелектронного відновлення молекулярного кисню. У клітинах він може генеруватися ферментативно, наприклад, за участі NADPH-оксидази або мітохондріального електронтранспортного ланцюга. Його накопичення здатне порушувати редокс-гомеостаз клітини, спричиняючи ушкодження білків, ліпідів та ДНК. Він відіграє ключову роль у подальшому утворенні більш токсичних сполук [13]. Зокрема, гідроксильний радикал є однією з найреактивніших АФК, що може утворюватися в організмі внаслідок реакцій за типом Фентона або Хабера-Вейса, за участі пероксиду водню та іонів перехідних металів. Через відсутність специфічних ферментів для його знешкодження, єдиним ефективним механізмом обмеження його утворення є запобігання накопиченню попередників – супероксиду та пероксиду водню [44].

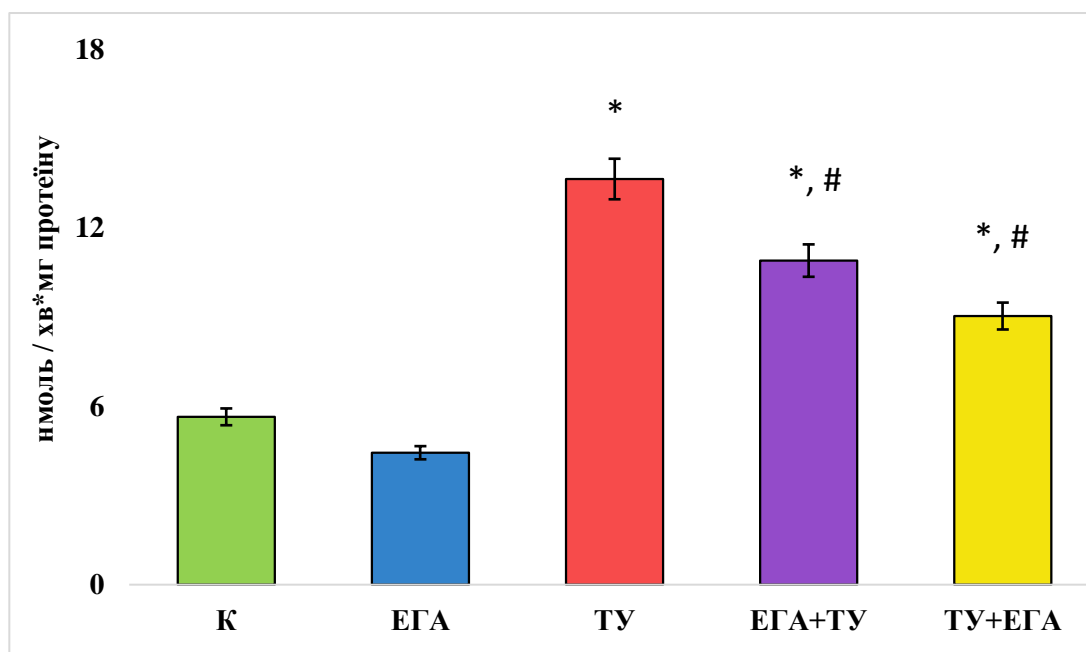


Рис. 3.1. Інтенсивність утворення супероксид аніон-радикалу у мітохондріях печінки тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*

Примітка (тут і надалі): К – контроль; ЕГА – тварини, які отримували екстракт *Hericium alpestre* протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг маси тіла; ТУ – тварини, які отримували токсичну дозу ацетамінофену; ЕГА+ТУ – тварини, які перед моделюванням токсичного ураження отримували екстракт *Hericium alpestre* протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг маси тіла; ТУ+ЕГА – тварини, які отримували екстракт *Hericium alpestre* протягом 7 днів у дозі 500 мг/кг маси тіла після токсичного ураження ацетамінофеном;

* – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $p < 0,05$;

– статистично достовірна різниця порівняно з групою ТУ, $p < 0,05$.

Окрім того, у тварин з токсичним ураженням спостерігається накопичення продуктів вільнорадикального ушкодження ліпідів і протеїнів, зокрема, ТБК-активних продуктів (рис. 3.3) та карбонільних похідних (рис. 3.4). Отримані результати свідчать про формування стану оксидативного стресу у тварин з передозуванням ацетамінофеном. Відомо, що гідроксильний радикал відіграє важливу роль у реакціях пероксидного окиснення ліпідів, окиснюючи поліненасичені жирні кислоти. Одним з кінцевих продуктів ПОЛ є малоновий діальдегід, рівень якого можна виміряти за допомогою реакції з тіобарбітуровою

кислотою. При цьому утворюються сполуки, які називають ТБК-активними продуктами [45].

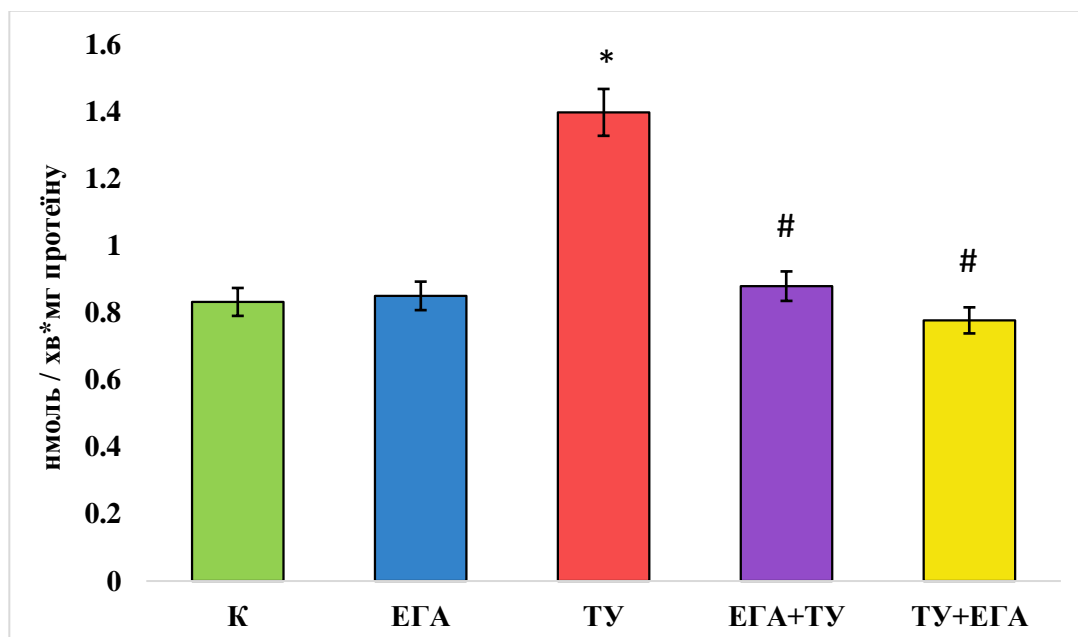


Рис. 3.2. Інтенсивність утворення гідроксильного радикала у мітохондріях печінки тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*

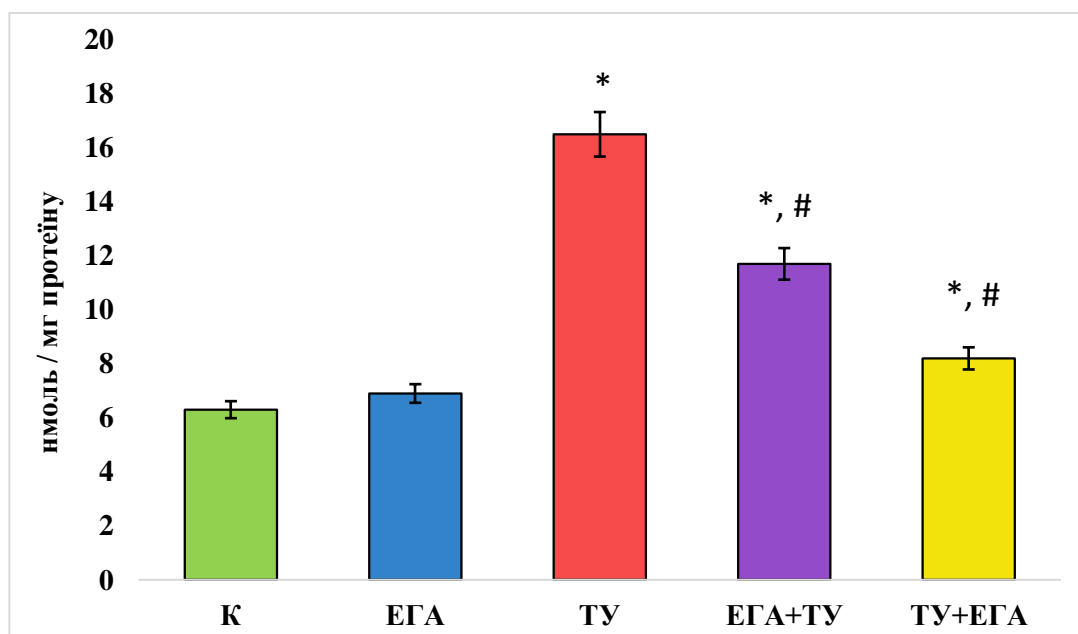


Рис. 3.3. Вміст ТБК-активних продуктів у мітохондріях печінки тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*

Маркером вільнорадикального ушкодження білків є накопичення карбонільних похідних. Вони утворюються внаслідок первинного карбонілювання за дії АФК на амінокислотні залишки треоніну, лізину, проліну та аргініну або вторинного карбонілювання, що відбувається опосередковано, в результаті реакції білків із продуктами ПОЛ, зокрема малоновим діальдегідом або 4-гідроксиноненалем [26].

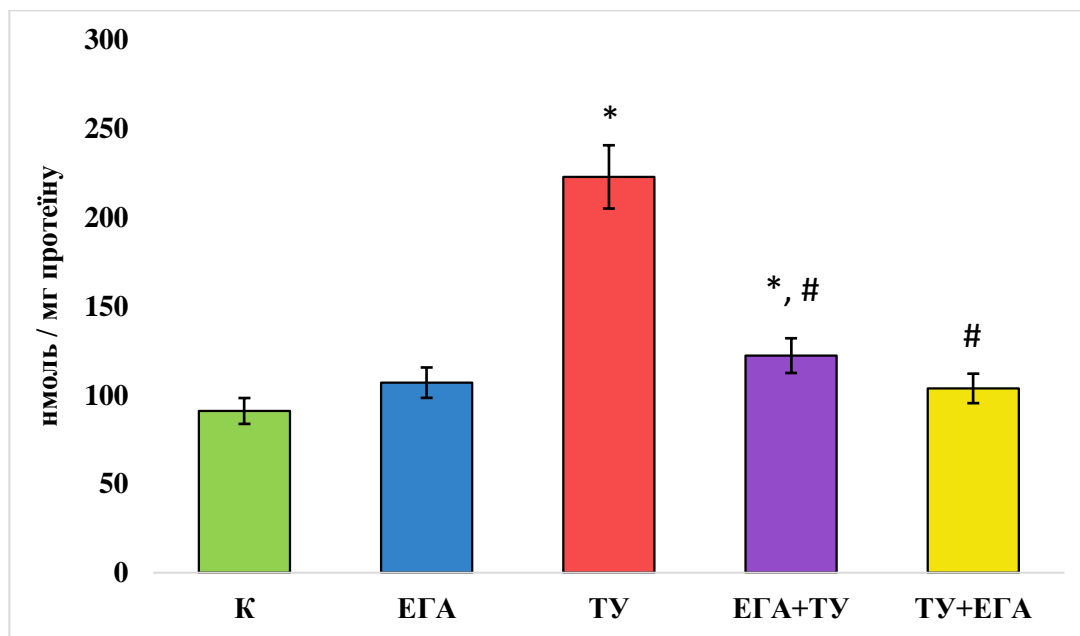


Рис. 3.4. Вміст карбонільних похідних у мітохондріях печінки тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*

Актуальним залишається пошук джерел біологічно активних сполук природного походження з антиоксидантним та гепатопротекторним потенціалом для корегування стану оксидативного стресу. На сьогоднішній день як джерело таких сполук розглядають гриби. Зокрема, в цьому контексті активно вивчають гриби роду *Hericium*. Серед них *Hericium alpestre* залишається практично не дослідженим.

Наші дослідження показали, що введення етанольного екстракту *Hericium alpestre* протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг маси тіла не впливає на інтенсивність вільнорадикальних процесів. Зокрема, інтенсивність утворення супероксиду та

гідроксильного радикала достовірно не змінюється порівняно з контролем (рис. 3.1, 3.2). При цьому не спостерігається змін у вмісті ТБК-активних продуктів і карбонільних похідних (рис. 3.3, 3.4). Тобто, екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* не впливає на інтенсивність вільнорадикальних процесів у здорових тварин.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу різних режимів введення екстракту тваринам з ацетамінофен-індукованою токсичністю. Попереднє введення екстракту протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг маси тіла перед моделюванням токсичного ураження ацетамінофеном призводить до зниження швидкості генерації супероксиду, первинної активної форми кисню, проте досліджуваний показник не повертається до значень контролю, на відміну від гідроксильного радикала, значення якого наближаються до контрольних (рис. 3.1, 3.2). Окрім того, у тварин цієї групи спостерігається достовірно зменшення вмісту ТБК-активних продуктів (рис. 3.3) і карбонільних похідних (рис. 3.4).

Найбільш виражене зниження швидкості генерації досліджуваних АФК спостерігається у групі тварин, яким вводили екстракт протягом 7 днів у дозі 500 мг/кг маси тіла після токсичного моделювання. При цьому спостерігається максимально виражене зниження накопичення продуктів окиснювальної модифікації ліпідів та протеїнів (рис. 3.3, 3.4).

У літературі показано, що гриби, як культивовані, так і дикорослі, мають значні антиоксидантні властивості, головним чином завдяки біоактивним компонентам, таким як поліфенольні сполуки, каротиноїди, полісахариди, вітаміни С та Е [46].

Отримані результати свідчать, що етанольний екстракт *Hericium alpestre* виявляє антиоксидантну активність та зменшує прояви оксидативного ушкодження основних макромолекул клітин. Проте подальшого дослідження потребує визначення сполук в екстракті гриба *Hericium alpestre*, які забезпечують антиоксидантні властивості.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю інтенсивність генерації супероксид аніон-радикала збільшується майже у 2,5 рази, а гідроксильного радикала – у 1,7 рази порівняно з тваринами контрольної групи, при цьому спостерігається накопичення продуктів вільнорадикального ушкодження ліпідів і протеїнів, зокрема, ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних.

2. Показано, що попереднє введення екстракту протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг маси тіла перед моделюванням токсичного ураження ацетамінофеном призводить до зниження швидкості генерації супероксиду, проте досліджуваний показник не повертається до значень контролю, на відміну від гідроксильного радикала, значення якого наближаються до контрольних. Окрім того, у тварин цієї групи спостерігається достовірне зменшення вмісту ТБК-активних продуктів і карбонільних похідних.

3. Встановлено, що найбільш виражене зниження швидкості генерації досліджуваних АФК спостерігається у групі тварин, яким вводили екстракт протягом 7 днів у дозі 500 мг/кг маси тіла після токсичного моделювання. При цьому спостерігається максимально виражене зниження накопичення продуктів окиснювальної модифікації ліпідів та протеїнів.

Отримані результати свідчать, що етанольний екстракт *Hericium alpestre* виявляє антиоксидантну активність та зменшує прояви оксидативного ушкодження основних макромолекул клітин печінки за умов передозування ацетамінофеном. Проте подальшого дослідження потребує визначення сполук в екстракті гриба *Hericium alpestre*, які забезпечують антиоксидантні властивості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Yan M., Huo Y., Yin S., Hu H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox biology*. 2018. Vol. 17. P. 274-283.
2. Fontes A., Alemany-Pagès M., Oliveira P. J., Ramalho-Santos J., Zischka H., Azul A. M. Antioxidant Versus Pro-Apoptotic Effects of Mushroom-Enriched Diets on Mitochondria in Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20 (16). P. 3987.
3. Qi J., Wu J., Kang S., Gao J., Liu H., Liu C. The chemical structures, biosynthesis, and biological activities of secondary metabolites from the culinary-medicinal mushrooms of the genus *Hericium*: A review. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2024. Vol. 22 (8). P. 676-698.
4. Ramachandran A., Jaeschke H. Acetaminophen toxicity: novel insights into mechanisms and future perspectives. *Gene expression*. 2018. Vol. 18 (1). P. 19-30.
5. Yoon E., Babar A., Choudhary M., Kutner M., Prysopoulos N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2016. Vol. 4 (2). P. 131-142.
6. Clark R., Fisher J. E., Sketris I. S., Johnston G. M. Population prevalence of high dose paracetamol in dispensed paracetamol/opioid prescription combinations: an observational study. *BMC clinical pharmacology*. 2012. Vol. 12 (11). P. 1-8.
7. Jaeschke H., McGill M. R., Williams C. D., Ramachandran A. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life sciences*. 2011. Vol. 88 (17-18). P. 737-745.
8. Sachdev S., Ansari S. A., Ansari M. I. Reactive oxygen species (ROS): An introduction. *Reactive Oxygen Species in Plants: The Right Balance*. 2023. P. 1-22.
9. Bolisetty S., Jaimes E. A. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *International journal of molecular sciences*. 2013. Vol. 14 (3). P. 6306-6344.

10. Lushchak V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*. 2014. Vol. 224. P. 164-175.
11. Ott M., Gogvadze V., Orreniu S., Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007. Vol. 12. P. 913-922.
12. Hopkins R. Z. Superoxide in biology and medicine: an overview. *Reactive Oxygen Species*. 2016. Vol. 1 (2). P. 99-109.
13. Winterbourn C. C. Biological chemistry of superoxide radicals. *ChemTexts*. 2020. Vol. 6 (1). P. 7.
14. Andrés C. M. C., Pérez de la Lastra J. M., Andrés Juan C., Plou F. J., Pérez-Lebeña E. Superoxide anion chemistry – Its role at the core of the innate immunity. *International journal of molecular sciences*. 2023. Vol. 24 (3). P. 1841.
15. Liu X., Sang Y., Yin H., Lin A., Guo Z., Liu Z. Progress in the mechanism and kinetics of Fenton reaction. *MOJ Ecol. Environ. Sci*. 2018. Vol. 3. P.10-14.
16. Treml J., Šmejkal K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2016. Vol. 15 (4). P. 720-738.
17. He L., He T., Farrar S., Ji L., Liu T., Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017. Vol. 44 (2). P. 532-553.
18. Sadasivam N., Kim Y. J., Radhakrishnan K., Kim D. K. Oxidative Stress, Genomic Integrity, and Liver Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2022. Vol. 27. P. 3159.
19. Marrocco I., Altieri F., Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017. Vol. 2017 (1). P. 2572.
20. Mas-Bargues C., Escriva C., Dromant M., Borrás C., Vina J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2021. Vol. 709. P. 108941.

21. Arauz J., Ramos-Tovar E., Muriel P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Annals of Hepatology*. 2016. Vol. 15 (2). P. 160-173.
22. Valgimigli L. Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection. *Biomolecules*. 2023. Vol. 13 (9). P. 1291.
23. Tejchman K., Kotfis K., Sieńko J. Biomarkers and Mechanisms of Oxidative Stress – Last 20 Years of Research with an Emphasis on Kidney Damage and Renal Transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22 (15). P. 8010.
24. Cordiano R., Di Gioacchino M., Mangifesta R., Panzera C., Gangemi S., Minciullo P. L. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update. *Molecules*. 2023. Vol. 28. P. 5979.
25. Gonos E. S., Kapetanou M., Sereikaite J., Bartosz G., Naparło K., Grzesik M., Sadowska-Bartosz I. Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging (Albany NY)*. 2018. Vol. 10 (5). P. 868-901.
26. Martínez-Orgado J., Martínez-Vega M., Silva L., Romero A., de Hoz-Rivera M., Villa M., del Pozo A. Protein Carbonylation as a Biomarker of Oxidative Stress and a Therapeutic Target in Neonatal Brain Damage. *Antioxidants*. 2023. Vol. 12. P. 1839.
27. Akagawa M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*. 2021. Vol. 55 (4). P. 307-320.
28. Butterfield D. A., Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature reviews. Neuroscience*. 2019. Vol. 20 (3). P. 148-160.

29. Fedorova M., Bollineni R. C., Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass spectrometry reviews*. 2014. Vol. 33 (2). P. 79-97.

30 Rathore H., Prasad S., Sharma S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition*. 2017. Vol. 5 (2). P. 35-46.

31. Muszyńska B., Grzywacz-Kisielewska A., Kała K., Gdula-Argasińska J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry*. 2018. Vol. 243. P. 373-381.

32. Liuzzi G. M., Petraglia T., Latronico T., Crescenzi A., Rossano R. Antioxidant Compounds from Edible Mushrooms as Potential Candidates for Treating Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*. 2023. Vol. 15 (8). P. 1913.

33. He X., Wang X., Fang J., Chang Y., Ning N., Guo H., Huang L, Huang X, Zhao Z. Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review. *International journal of biological macromolecules*. 2017. Vol. 97. P. 228-237.

34. Kostanda E., Musa S., Pereman I. Unveiling the Chemical Composition and Biofunctionality of *Hericium* spp. Fungi: A Comprehensive Overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. Vol. 25 (11). P. 5949.

35. Contato A. G., Conte-Junior C. A. Lion's Mane Mushroom (*Hericium erinaceus*): A Neuroprotective Fungus with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Potential – A Narrative Review. *Nutrients*. 2025. Vol. 17 (8). P. 1307.

36. Kopylchuk H., Voloshchuk O., Pasailiuk M. Comparison of total amino acid compositions, total phenolic compounds, total flavonoid content, β -carotene content and hydroxyl radical scavenging activity in four wild edible mushrooms. *Italian Journal of Mycology*. 2023. Vol. 52 (1). P. 112-125.

37. Voloshchuk O. M., Kopylchuk G. P., Ursatyy M. S. The ratio of ubiquinon redox forms in the rat liver mitochondria under conditions of different nutrient supply. *Fiziolohichnyi zhurnal*. 2020. Vol. 66 (6). P. 82-87.

38. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. I., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951. Vol. 193 (1). P. 265-275.

39. Kostenko V. O., Tsebrzhins'kii O. I. Production of superoxide anion radical and nitric oxide in renal tissues sutured with different surgical suture material. *Fiziolohichnyi zhurnal*. 2000. Vol. 46 (5). P. 56-62.

40. Tkachenko M. M., Sahach V. F., Baziliuk O. V., Kotsiuruba A. V., Popereka H. M., Stepanenko L. H., Seniuk O. F. Agerelated characteristics of contractile vascular reactions and the content of oxygen free radicals and nitric oxide metabolites in BALB/c mice in conditions of alienation zone. *Fiziolohichnyi zhurnal*. 2005. Vol. 51 (3). P. 32-41.

41. Rodrigues T., de França L. P., Kawai C., de Faria P. A., Mugnol K. C. U., Braga F. M., Tersariol I. L. S., Smaili S. S., Nantes I. L. Protective role of mitochondrial unsaturated lipids on the preservation of the apoptotic ability of cytochrome C exposed to singlet oxygen. *The Journal of biological chemistry*. 2007. Vol. 282 (35). P. 25577-25587.

42. Parihar M. S., Pandit M. K. Free radical induced increase in protein carbonyl is attenuated by low doses of adenosine in hippocampus and mid brain: implication in neurodegenerative disorders. *General physiology and biophysics*. 2003. Vol. 22 (1). P. 29-39.

43. Jaeschke H., Akakpo J. Y., Umbaugh D. S., Ramachandran A. Novel therapeutic approaches against acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *Toxicological Sciences*. 2020. Vol. 174 (2). P. 159-167.

44. Jomova K., Raptova R., Alomar S. Y., Alwasel S. H., Nepovimova E., Kuca K., Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of toxicology*. 2023. Vol. 97 (10). P. 2499-2574.

45. Ito F., Sono Y., Ito T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants*. 2019. Vol. 8 (3). P. 72.

46. Łysakowska P., Sobota A., Wirkijowska A. Medicinal Mushrooms: Their Bioactive Components, Nutritional Value and Application in Functional Food Production – A Review. *Molecules*. 2023. Vol. 28 (14). P. 5393.

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Під час роботи в лабораторії необхідно дотримуватися наступних заходів безпеки:

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

Правила роботи з реактивами

- концентровані кислоти та луги повинні знаходитися 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 отруєння 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 лише призначеною для цього піпеткою і в будь-якому разі не плутати їх;
- у випадку потрапляння на шкіру концентрованої кислоти, уражене місце необхідно промити великою кількістю води, а потім розведеним розчином натрію;
- 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 лише сірником;
- у пробірці можна нагрівати лише невелику кількість розчину, рідина повинна займати не більше 1/3 об'єму пробірки;
- пробірку при нагріванні необхідно спрямовувати в бік 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 пробірку 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 рідини (час від часу відводити пробірку від полум'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 потрібно покласти вату, змочену розчином перманганату калію.

Правила роботи з лабораторним обладнанням

Центрифуги

- перед центрифугуванням центрифужні пробірки врівноважують та розміщують у центрифугі 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 3-5 мм (фаза В);
- набрати рідину в наконечник повільно відпускаючи кнопку, трохи почекати і вийняти наконечник з рідини (фаза С);
- доторкнутися наконечником до внутрішньої стінки посудини і спорожнити наконечник, плавно натискаючи кнопку до першого упору з такою ж швидкістю як при взятті проби (фаза D);
- почекати близько 1 секунди, натискаючи кнопку піпетки до другого упору, видалити залишки рідини і вийняти піпетку, ковзаючи наконечником по внутрішній стінці посудини (фаза E);
- 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 більш ніж на 5°C рекомендується багаторазово прополоскати наконечники;
- після закінчення роботи слід помістити піпетку в штативі.