

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

**АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ І ТА ІІ КОМПЛЕКСІВ ДИХАЛЬНОГО
ЛАНЦЮГА У ПЕЧІНЦІ 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
спеціальності 091 Біологія
Петрашук О.С.
Керівник:
кандидат біологічних наук
доцент **Волощук О.М.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол №__ від_____2025 р.
Зав. кафедри _____ Волощук О.М.

Чернівці, 2025

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена визначенню активності ензимів I та II комплексів дихального ланцюга у печінці тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов різних режимів введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*.

Показано, що у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном спостерігається достовірне зниження ензиматичної активності НАДН-дегідрогенази (компонента I комплексу) та сукцинатдегідрогенази (компонента II комплексу дихального ланцюга). Водночас попереднє введення екстракту *Hericium alpestre* у дозі 200 мг/кг впродовж 10 днів перед введенням токсичних доз ацетамінофену призводить до підвищення НАДН-дегідрогеназної та сукцинатдегідрогеназної активності порівняно з тваринами з інтоксикацією ацетамінофеном, які не отримували екстракт. Аналогічний ефект спостерігається при введенні етанольного екстракту досліджуваного гриба у дозі 500 мг/кг протягом 7 днів після моделювання токсичного ураження ацетамінофеном.

Отримані результати вказують на перспективність подальшого дослідження механізмів впливу біологічно активних сполук екстрактів *Hericium alpestre* на функціонування ензимів дихального ланцюга.

Ключові слова: *Hericium alpestre*, ацетамінофен, печінка, мітохондрії, НАДН-дегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа.

ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to the determination of the activity of enzymes I and II of the respiratory chain complexes in the liver of animals with acetaminophen-induced toxicity under different regimens of administration of ethanol extract of *Hericium alpestre*.

It has been shown that in animals with acetaminophen toxicity there is a significant decrease in the enzymatic activity of NADH dehydrogenase (component I of the complex) and succinate dehydrogenase (component II of the respiratory chain complex). At the same time, preliminary administration of *Hericium alpestre* extract at a dose of 200 mg/kg for 10 days before the administration of toxic doses of acetaminophen leads to an increase in NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase activity compared to animals with acetaminophen intoxication that did not receive the extract. A similar effect was observed when the ethanolic extract of the studied fungus was administered at a dose of 500 mg/kg for 7 days after modeling acetaminophen toxicity.

The obtained results indicate the prospects for further study of the mechanisms of influence of biologically active compounds of *Hericium alpestre* extracts on the functioning of respiratory chain enzymes.

Keywords: *Hericium alpestre*, acetaminophen, liver, mitochondria, NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase.

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

_____ **О.С.Петрашук**
(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1. Механізми впливу ацетамінофену на стан системи енергозабезпечення....	7
2. Особливості будови I комплексу дихального ланцюга.....	11
3. Біологічна роль та будова II комплексу дихального ланцюга.. ..	15
4. Гриби як джерело біологічно активних сполук з терапевтичною активністю.....	20
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	24
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	27
ВИСНОВКИ	31
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	32
ДОДАТКИ	35

ВСТУП

Упродовж останніх десятиліть гриби привертають все більшу увагу науковців завдяки своїм цінним харчовим і лікувальним властивостям. Вони мають характерний смак і аромат, а також високу поживну цінність, що робить їх важливим компонентом раціону людини [19]. Крім того, гриби є джерелом численних біологічно активних сполук, головним чином вторинних метаболітів, таких як терпени, стероїди, антрахінони, похідні бензойної кислоти та хінолонів, а також деяких первинних метаболітів, таких як щавлева кислота, пептиди [14]. Вони також є джерелом полісахаридів (α/β -D-глюканів), білків, вітамінів (B1, B2, B12, C, D та E), мінералів та незамінних амінокислот; вони мають низький вміст жиру, але містять цінні поліненасичені жирні кислоти [7]. Гриби можуть бути джерелом багатьох нутрицевтиків і можуть використовуватися безпосередньо в раціоні людини для зміцнення здоров'я.

Відомо, що екстракти багатьох грибів володіють лікувальними властивостями, зокрема антиоксидантними, протипухлинними, протидіабетичними, протиалергічними, імуномодулюючими і гепатопротекторними. У цьому контексті особливу увагу привертають природні біологічно активні сполуки грибів, екстракти яких володіють антиоксидантними та гепатопротекторними властивостями. Гриби роду *Hericium*, відомі своїм незвичайним виглядом та корисними властивостями, останнім часом стали об'єктом активних досліджень. Попри загальну цікавість грибами цього роду, дослідження *Hericium alpestre* залишаються обмеженими, що підкреслює важливість детального вивчення його біологічної активності [14]. Фармакологічні властивості лікарських грибів здебільшого вивчають за допомогою аналізів *in vitro*, які часто супроводжуються або доповнюються дослідженнями *in vivo* на тваринних моделях. Такий підхід дозволяє повніше оцінити потенціал самих грибів, їхніх екстрактів або окремих хімічних сполук. Водночас існує обмежена

кількість клінічних досліджень за участю людей, результати яких опубліковані в рецензованих наукових виданнях [25].

Для моделювання гепатотоксичних станів у експериментальній біології використовують ацетамінофен, поширений жарознижувальний препарат. Відомо, що ступінь ушкодження гепатоцитів та їх ступінь відновлення пов'язані з енергетичним забезпеченням клітин, ключову роль у якому відіграє дихальний ланцюг. Важливими ензимами є НАДН-дегідрогеназа, яка є компонентом I комплексу, і сукцинатдегідрогеназа, яка є ензимом II комплексу.

Метою роботи було визначення активності ензимів I та II комплексів дихального ланцюга у печінці тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*.

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

1. Визначити активність НАДН-дегідрогенази в мітохондріях печінки щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.
2. Визначити активність сукцинатдегідрогенази у печінці тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Механізми впливу ацетамінофену на стан системи енергозабезпечення

Парацетамол (відомий також як ацетамінофен, N-ацетил-*p*-амінофенол або АРАР) є популярним знеболювальним і жарознижувальним препаратом, який широко застосовується як у рецептурних, так і в безрецептурних формах. Його часто обирають як засіб першої лінії для пацієнтів із хронічними захворюваннями печінки (ХЗП), оскільки він має менше побічних ефектів порівняно з нестероїдними протизапальними препаратами (НПЗП) і опіоїдами [10].

У терапевтичних дозах (від 500 до 1000 мг три-чотири рази на добу для дорослих) парацетамол зазвичай добре переноситься і рідко викликає серйозні побічні реакції. Однак уже в кінці 1960-х років стало відомо, що передозування парацетамолом може призвести до важкої гепатотоксичності, печінкової недостатності, порушення функцій нирок і навіть смерті.

Найчастіше передозування відбувається випадково або навмисно. Одноразовий прийом дози понад 10 г або від 150 – 200 мг/кг становить ризик для печінки. Проте навіть менші дози можуть бути небезпечними, особливо для осіб із хронічним алкоголізмом або анорексією [4].

Печінковий метаболізм АРАР

АРАР є слабокислою сполукою з $pK_a \approx 9,5$. За фізіологічного рН він практично нейтральний і швидко всмоктується в організмі, переважно в дванадцятипалій кишці. У людини він активно метаболізується, а період його напіврозпаду в крові після прийому терапевтичної дози становить 1,5 – 3 години [1].

Після вживання терапевтичної дози АРАР здебільшого перетворюється на фармакологічно неактивний глюкуронід (АРАР-gluc, 52 – 57% метаболітів сечі) і сульфат (АРАР сульфат, 30 – 44%) кон'югати, при цьому незначна частина окислюється до реакційно здатного метаболіту N-ацетил-*p*-бензохіноніміну або NAPQI (5 – 10%) та активує продукування активних

форм кисню (АФК). Менше 5% АРАР виводиться в незміненому вигляді. NAPQI має високу реакційну здатність і головним чином відповідає за гепатотоксичність, спричинену ацетамінофеном. Детоксикація NAPQI відбувається через його зв'язування з нуклеофільними сульфгідрильними групами глутатіону (GSH) з утворенням АРАР-GSH, який зрештою виводиться із сечею у вигляді кон'югатів цистеїну та меркаптурової кислоти (АРАР-cys). Розподіл ацетамінофену включає складний міжорганний транспорт метаболітів між печінкою, нирками та кишечником, через жовч і кровотік, для остаточного виведення з сечею. З печінки більшість глюкуронідних і сульфатних метаболітів транспортується в нирки через кровотік, тоді як деяка кількість АРАР-gluc з'являється в жовчі з подальшим транспортуванням через кишечник у кров. Нирки є основним місцем диспозиції АРАР сульфату, або шляхом прямого виведення, або шляхом подальшої біотрансформації з подальшим виведенням нирками. Хоча більша частина NAPQI утворюється в печінці, нирки також метаболізують АРАР до токсичного метаболіту та вивільняють цистеїновий кон'югат АРАР у жовч і кров для подальшого виведення з сечею.

При надтерапевтичних дозах АРАР (понад 4 г/добу) шлях сульфатації стає насиченим, а глюкуронідація та окислення посилюються, менша кількість виводиться в незміненому вигляді. Після високотоксичної дози АРАР глюкуронізація також насичується, і більші пропорції препарату окислюються до NAPQI (>15%) [18]. Надлишок NAPQI зрештою виснажує запаси GSH і починає утворювати аддукти мітохондріальних білків через зв'язування з групами цистеїну на клітинних білках (рис.1).

NAPQI в основному націлений на мітохондріальні білки та іонні канали, що призводить до втрати виробництва енергії, іонного дисбалансу та смерті клітин. Хоча агенти, які запобігають або поглинають мітохондріальні АФК, і пероксинітрит є найбільш перспективними для гепатотоксичності АРАР, важливість захисту GSH від реактивного метаболіту (NAPQI)

призвела до використання N-ацетилцистеїну (NAC) як антидоту гепатотоксичності APAP у клінічній практиці [1].

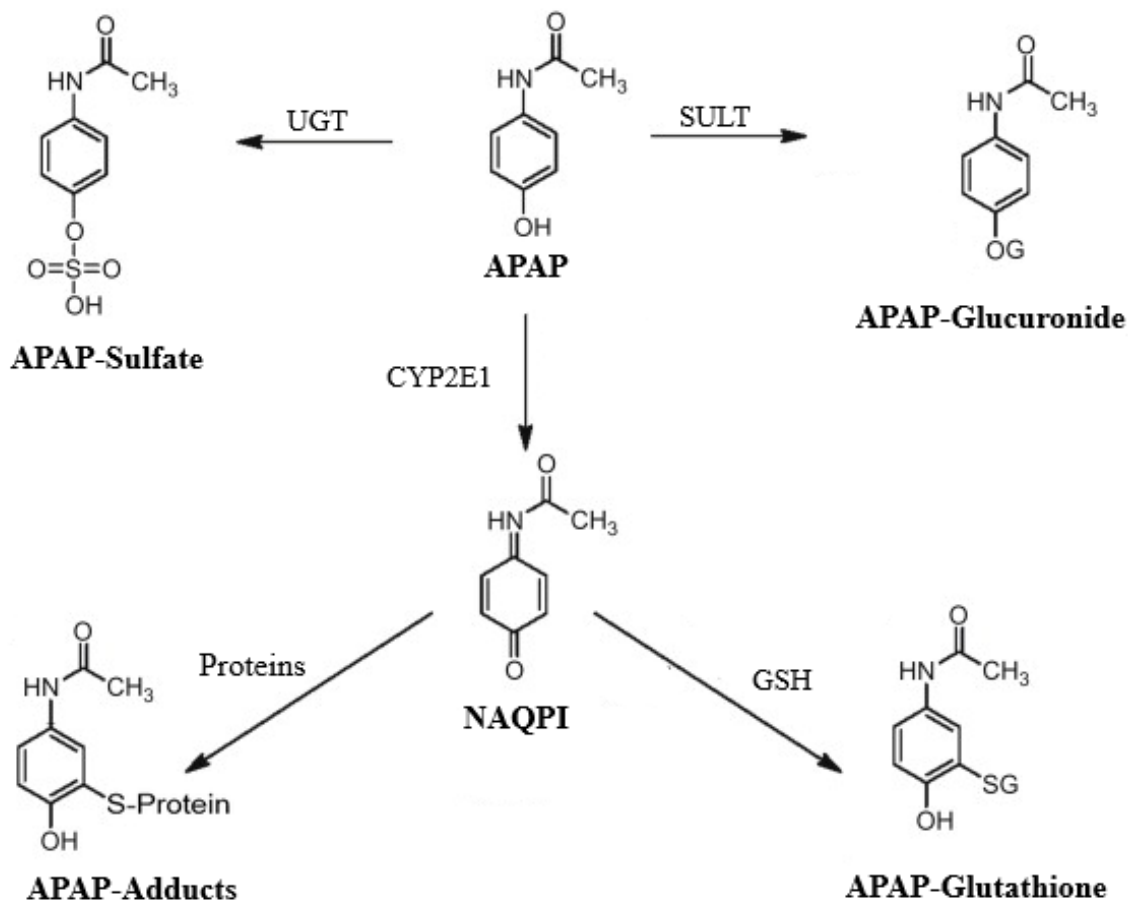


Рис.1. Шляхи метаболізму ацетамінофену [17]

NAC поповнює запаси GSH, поглинає активні форми кисню в мітохондріях і покращує метаболічний шлях сульфатації. При введенні протягом 8 – 10 годин після гострого передозування NAC знижує ризик гепатотоксичності до менш ніж 5%. Загалом NAC запобігає пошкодженню печінки, нирковій недостатності та смерті, а також є препаратом вибору при отруєнні APAP [18].

Утворюючи білкові аддукти, NAPQI, збільшує виробництво супероксидних радикалів, які можуть реагувати з радикалами оксиду азоту з утворенням дуже потужного окисника та нітруючого виду пероксинітриту. Також встановлено, що пероксинітрит є справжнім токсичним медіатором індукованої парацетамолом клітинної смерті. Хоча GSH є ефективним

поглиначем пероксинітриту, виснаження GSH реактивним метаболітом парацетамолу порушує цю лінію захисту. Іншим механізмом мінімізації утворення пероксинітриту є прискорення дисмутації супероксиду до пероксиду водню та кисню, що каталізується ендогенною мітохондріально-специфічною супероксиддисмутазою 2 (MnSOD), яка інактивується нітруванням білка під час передозування парацетамолом [11].

Надмірно високі дози парацетамолу (АРАР) можуть спричинити тяжке ураження печінки, що супроводжується значним зниженням здатності організму до глюкуронізації та сульфатації. У пацієнтів із летальним центрілобулярним некрозом печінки рівні глюкуронідних метаболітів у плазмі та сечі практично не виявляються. Тому, основним методом лікування наразі залишається застосування N-ацетилцистеїну (NAC), який діє як антидот, однак патогенез гепатотоксичності, спричиненої ацетамінофеном (ГСА), є надзвичайно складним і включає цілу низку клітинних процесів: окиснювальний стрес, мітохондріальну дисфункцію, стерильне запалення, аутофагію, порушення мікроциркуляції та інші. Особливо важливою є роль мітохондріального окисного стресу, що робить його перспективною мішенню для нових терапевтичних підходів. Незважаючи на позитивні результати досліджень окремих біологічно активних речовин, необхідні подальші клінічні дослідження для оцінки їхньої ефективності та безпеки [17,18].

Будова та функції дихального ланцюга

Дихання є однією з ключових і базових функцій живих організмів [16]. У ссавців система окисного фосфорилування (OXPHOS) складається з п'яти мультибілкових ферментних комплексів і двох мобільних переносників електронів, які розміщені у внутрішній мембрані мітохондрій. Чотири з цих комплексів (CI – CIV) формують мітохондріальний дихальний ланцюг, що забезпечує перенесення електронів від відновлених форм до молекулярного кисню. Цей процес супроводжується утворенням протонного градієнта через внутрішню мембрану, що в подальшому використовується АТФ-синтазою (комплекс V) для синтезу аденозинтрифосфату (АТФ).

Біогенез усіх п'яти ферментних комплексів вимагає наявності не лише структурних субодиниць, а й великої кількості допоміжних білків, що беруть участь у дозріванні субодиниць, приєднанні простетичних груп і формуванні функціонально активних комплексів.

Основне завдання мітохондріального метаболізму – виробництво АТФ шляхом аеробного окислення субстрату. Цей ланцюг представлений послідовним перенесенням електронів через чотири основні мультиферментні комплекси: NADH-дегідрогеназу: убіхінон оксидоредуктаза (комплекс I), убіхінол: цитохром c оксидоредуктаза або сукцинатдегідрогеназа (комплекс II), комплекс цитохрому *bc1* (комплекс III) і цитохром *c*-оксидазу (комплекс IV). Крім того, електронний транспорт здійснюється за участю двох рухомих переносників: убіхінону, також відомого як коензим Q (CoQ), розчиненого в ліпідному бішарі мембрани, та гідрофільного гемового білка цитохрому *c* (сyt *c*), який локалізується на зовнішній стороні внутрішньої мембрани. У підсумку, дихальний ланцюг забезпечує перенесення протонів і електронів від субстратів до кінцевого акцептора – кисню, створюючи енергетичні умови для перетворення аденозиндифосфату (АДФ) [9].

2. Особливості будови I комплексу дихального ланцюга

Одним із найбільших макромолекулярних комплексів є мітохондріальний комплекс I, який відіграє важливу роль у виробництві клітинної енергії. Комплекс I бере участь у дихальному транспорті електронів і сприяє утворенню рушійної сили протонів, необхідної для синтезу АТФ. Крім того, комплекс I виробляє активні форми кисню (АФК), які можуть бути шкідливими, але також важливі для сигналізації клітин. Дефекти цього ферменту викликають серйозні порушення енергетичного обміну.

Комплекс I ссавців складається з 44 різних субодиниць. Для формування повноцінного голокомплексу необхідна участь щонайменше 13

відомих факторів збірки. З 44 субодиниць 37 закодовані в ядерній ДНК, а сім – закодовані в мітохондріальній ДНК; останні, відомі як центральні субодиниці, оскільки вони також є складовими бактеріального комплексу I і виконують основні біоенергетичні функції. Решта 30 білків називаються допоміжними або надлишковими субодиницями. Щоб зрозуміти задіяні механізми, надзвичайно важливо усвідомити, як збираються ці макромолекулярні комплекси та як це збирання регулюється. Фактори збирання відіграють важливу роль у пропусканні субодиниць мітохондріального і ядерного кодування, а також беруть участь у біогенезі кофакторів, таких як залізо-сірчані кластери, що необхідні для формування функціонального ферменту.

З точки зору механіки, збірка комплексу I охоплює кілька процесів, які необхідно чітко регулювати та взаємопов'язувати, щоб забезпечити зрілий і функціональний комплекс. Процес починається з мітохондріальної та ядерної транскрипції субодиниць комплексу I та факторів складання, продовжується мітохондріальною та цитозольною трансляцією, імпортом білків, кодованих ядром, вставкою кофакторів і триває, поки зібраний комплекс повністю не вставиться у внутрішню мембрану. Багато з цих процесів, від транскрипції до мітохондріального імпорту, є загальними для інших комплексів системи окисного фосфорилування. Інші, такі як додавання кофакторів і введення в мембрану, є специфічними для кожного комплексу та включають спеціальні фактори складання [20].

Склад, механізм та структура

Мітохондріальний комплекс I – це «L»-подібний фермент, що складається з гідрофільного плеча, яке виступає в матрикс, та гідрофобного плеча, яке вбудоване у внутрішню мембрану. Матричне плече містить дві ферментативно відмінні ділянки: N-модуль знаходиться на кінці плеча і бере участь в окисненні NADH електронами, що проникають через Q-модуль вздовж кластерів Fe-S до убихінону. У поєднанні з окисно-відновними реакціями мембранне плече (або P-модуль) зазнає конформаційних змін для

полегшення векторної транслокації протонів з матриксу в міжмембранний простір. Цей транспорт протонів створює різницю потенціалів через мембрану, яка називається «протонною силою», що використовується мітохондріальною F1Fo-АТФазою для генерації АТФ.

N-модуль містить три основні субодиниці (NDUFS1, NDUFV1, NDUFV2 за номенклатурою) та флавіновий мононуклеотид (FMN), тоді як Q-модуль містить чотири основні субодиниці (NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8) та залізо-сірчаний кластер кофакторів. Мембранний рукав містить сім високогідрофобних субодиниць, кожна з яких кодується мтДНК (ND1-6 і ND4L). Нещодавно було встановлено, що як у ссавців, так і в бактеріальному комплексі I окислення одного NADH (тобто перенесення 2 електронів) призводить до транслокації чотирьох протонів через мембрану. Було припущено, що транслокація протонів опосередкована конформаційним зв'язком через бічну альфа-спіраль у субодиниці ND5, яка лежить площинно до мембрани і простягається близько до сайту зв'язування убіхінону. Однак дані, отримані в результаті хімічного зшивання латеральної спіралі з мембранним плечем комплексу I, що обмежує рух, свідчать про те, що транспорт електронів може бути пов'язаний з транслокацією протонів за допомогою неідентифікованих механізмів.

Початкова структурна характеристика мембранного плеча бактеріального комплексу I показала, що гомологи субодиниць, які кодуються мтДНК ссавців, мають нові «антипортерні» складки, що складаються з двох інвертованих повторів у кожній, які формують чотири передбачувані протонні канали через мембрану.

Модульна збірка комплексу I

Довгий час вважалося, що комплекс I збирається поетапно, що характеризується дискретними проміжними продуктами, кожен з яких складається з декількох субодиниць (включаючи ядерні та мтДНК-кодовані субодиниці, а також фактори збірки). Ці субодиниці об'єднуються разом у регульований спосіб, причому фактори збірки відокремлюються від складних

проміжних продуктів у міру дозрівання структури. Крім того, було показано, що комплекси III і IV відіграють важливу роль у збиранні та стабільності комплексу I. Також було встановлено, що проміжні продукти збирання комплексу I діють як каркас для побудови комплексів III і IV, утворюючи надскладну структуру, хоча нещодавно було висловлено припущення, що комплекс I збирається першим перед тим, як взаємодіяти з цими комплексами. Цікаво, що деякі субодиниці не можуть бути чітко віднесені до певного модуля і можуть знаходитись на межі розділу між модулями, або їхнє включення є тимчасово відмінним від решти модуля. Прикладом цього є NDUFA11, який структурно належить до модуля ND2, оскільки він розташований в області мембрани, що прилягає до субодиниці ND2. Однак, пошкодження NDUFA11 призводить до дефекту, подібного до втрати субодиниці модуля ND5.

Інші субодиниці, які не можуть бути віднесені до окремого модуля, включають NDUFB4, NDUFB6 і NDUFA9. Згідно з останніми крио-ЕМ структурами, NDUFB6 розташована між модулями ND4 і ND5. NDUFA9 знаходиться на Q-модулі комплексу I, і за відсутності цієї субодиниці мембранне плече комплексу I все ще може збиратися. Це контрастує з іншою допоміжною субодиницею Q-модуля NDUFA5, відсутність якої призводить до втрати субкомплексів мембранного плеча. Включення NDUFA9 до складу Q-модуля також підтверджується комплексним аналізом, який показує, що NDUFA9 збирається після інших субодиниць Q-модуля.

Механізм складання комплексу I

Біогенез субодиниць комплексу I залежить від різноманітних мітохондріальних процесів, включаючи механізми імпорту білків, молекулярні шаперони, мембранні інсертази та білки приєднання кофакторів. Ці процеси є критично важливими для різноманітних функцій мітохондрій, і їх порушення може призвести до летальних наслідків. Однак для збирання самого комплексу I також потрібен спеціальний набір білків, відомий як фактори збирання. На сьогоднішній день виявлено 13 факторів збірки

комплексу I, які беруть участь у біогенезі різних модулів комплексу I. Хоча багатьом факторам збірки комплексу I були дані назви при їх першій публікації, вони часто були перейменовані, щоб містити префікс «NDUFAF» – для NADH-дегідрогенази (NDU), альфа-субкомплексу (F), фактора збірки (AF) плюс номер порядку їх відкриття [8].

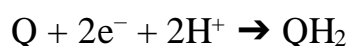
3. Біологічна роль та будова II комплексу дихального ланцюга

Ензимом II комплексу дихального ланцюга є сукцинатдегідрогеназа (EC 1.3.5.1), яка відіграє вирішальну роль у двох основних ключових метаболічних шляхах для генерації АТФ: у циклі Кребса (відомому також як цикл трикарбонних кислот, або TCA) та в окисному фосфорилуванні (OXPHOS). Він може функціонувати як в аеробному енергетичному метаболізмі [називається сукцинат-убіхінонредуктаза (SQR) або сукцинатдегідрогеназа (SDH)], так і в анаеробному енергетичному метаболізмі [називається хінолфумаратредуктаза (QFR) або фумаратредуктаза (FRD)] у мітохондріях ссавців [6].

SDH каталізує окислення сукцинату в фумарат згідно з наступним рівнянням:



Два протони та електрони відповідають окисненню сукцинату з відщепленням двох атомів водню. Хінон (коензим Q) відновлюється за рівнянням:



Атомна структура SDH відома з кристалографічних досліджень. Шлях для електронів від сукцинату до хінону знаходиться в межах SDH; навпаки, очікується, що протони будуть вивільнені або захоплені з навколишнього середовища [3].

На основі виконуваної *in vivo* реакції та типу використовуваного хінону ферменти SDH/FRD поділяються на три класи: ферменти класу 1 окислюють

сукцинат і відновлюють високопотенційний хінон (такий як убіхінон); ферменти класу 2 (FRD) відновлюють фумарат із використанням низькопотенційного хінолу (наприклад, менахінолу); ферменти класу 3 здійснюють окиснення сукцинату через низькопотенційний хінон. На сьогодні визначити, яку саме реакцію каталізує певний фермент SDH/FRD, лише за первинною амінокислотою послідовністю неможливо, для цього потрібні експерименти *in vivo* [12].

На відміну від інших комплексів дихального ланцюга мітохондрій, комплекс II повністю кодується аутосомними генами; комплекси I, III, IV і V включають структурні субодиниці, кодовані власним генетичним матеріалом мітохондрій – мтДНК. Комплекс II є найменшим комплексом у системі ОХРНОС, він складається лише з чотирьох структурних субодиниць, кодованих генами з однаковою назвою: SDHA, SDHB, SDHC і SDHD. Щоб досягти специфічної четвертинної структури комплексу II, необхідні чотири фактори збірки (SDHAF1-4) для координації його біогенезу; вони заковані генами SDHAF1, SDHAF2, SDHAF3, SDHAF4. У сукупності гени, що кодують структурні субодиниці та фактори складання, називаються генами «SDHx».

Незважаючи на свій мініатюрний розмір, комплекс має вирішальне значення для двох метаболічних шляхів. Каталітичне ядро, утворене флавопротеїновою субодиницею SDHA та залізо-сірковим кластерним білком SDHB, виступає всередину матриці. Структура також включає комплекс II дихального ланцюга, де гетеродимер SDHA-SDHB з'єднується з інтегральними мембранними білками SDHC і SDHD, вбудованими у внутрішню мітохондріальну мембрану. Найбільша субодиниця, SDHA, має молекулярну масу 70 кДа і містить ковалентно приєднаний флавінаденіндинуклеотид (FAD). Він також містить сайт зв'язування сукцинату, де сукцинат окислюється до фумарату в циклі трикарбонових кислот. SDHB, залізо-сірчаний білок вагою 27 кДа, містить три залізо-сірчані кластери, які приймають два електрони, що утворюються в результаті

окислення сукцинату, і передають їх убіхінону у внутрішній мітохондріальній мембрані для переміщення вниз по системі OXPHOS до комплексу III. На відміну від інших комплексів мітохондріального дихального ланцюга, комплекс II не сприяє протонному градієнту, який стимулює фосфорилування АДФ АТФ-синтазою (комплекс V). На додаток до кофактора FAD, SDH також містить простетичний гем b між пов'язаними з інтегральною мембраною субодиницями SDHC і SDHD, а також сайт зв'язування убіхінону. Простетична група гема b вбудована між SDHC і SDHD через консервативні залишки гістидину; його точна роль ще не визначена, хоча він не бере безпосередньої участі в переносі електронів від FAD до убіхінону, а також не відіграє значної ролі в пригніченні або виробництві АФК. Натомість дослідження планарності порфіринового кільця в гемі b *Escherichia coli* засвідчили структурну неоднорідність зі зміною стану, пов'язаного з окислювально-відновним станом убіхінону *in vivo*, що свідчить про роль гему b у молекулярній сигналізації.

Після трансляції на цитозольних рибосомах кожна субодиниця комплексу II транслокується в мітохондріальний матрикс через системи імпорту TIM/TOM перед згортанням, включенням кофактора і, нарешті, збіркою в голофермент SDH. Три залізо-сірчані кластери комплексу II: [2Fe-2S], [3Fe-4S] і [4Fe-4S] генеруються мітохондріальним механізмом, включаючи Frataxin, NSD11, ISCU і NFS1, які потім переносяться в білковий комплекс Fe-S, що складається з HSC20, HSPA9 і ISCU; кластери Fe-S вставляються в SDHB через взаємодію з фактором складання SDHAF1 (раніше відомим як LYRM8), який рекрутує залізо-сірчаний каркас HSC20-HSPA9-ISCU через мотиви LYR. Було показано, що SDHAF2 стимулює ковалентне зв'язування кофактора FAD у SDHA. Вважається, що SDHAF3 захищає відкриті залізо-сірчані кластери в SDHB від активних форм кисню під час процесу дозрівання. Нарешті, SDHAF4 служить шапероном для полегшення утворення гетеродимерів SDHA і SDHB [4].

Середні потенціали функціональних груп комплексу становлять: FAD: - 79 мВ, [2Fe-2S]: 0 мВ, [4Fe-4S]: - 260 мВ, [3Fe-4S]: + 60 мВ, coQ: + 113 мВ, гем b: - 185 мВ [23].

Інгібітори SDH

Рецептор-асоційований білок фактора некрозу 1 (TRAP1) – це мітохондріальний шаперон, який високо експресується в багатьох типах пухлин, таких як гліобластома, рак товстої кишки, молочної залози, передміхурової залози та легенів, і часто асоціюється з лікарською резистентністю. TRAP1 є єдиним членом сімейства білків теплового шоку 90 (HSP90), який безпосередньо взаємодіє з дихальними комплексами, інгібуючи комплекс II, шляхом модуляції ферментативної активності SDH. Інгібування SDH за допомогою TRAP1 індукує псевдогіпоксію шляхом стабілізації HIF1 α , а також скасовує залежне від АФК відкриття мітохондріальної перехідної пори проникності (PTP), мінімізуючи окиснювальне пошкодження пухлинних клітин і сприяючи пухлиногенезу *in vitro*.

Іншим інгібітором СДГ є ітаконат, один з найбільш індукованих метаболітів в активованих макрофагах. Ітаконат інгібує SDH-опосередковане окислення сукцинату, що призводить до накопичення сукцинату. Більше того, в моделі *in vivo* лікування екзогенним ітаконатом підвищує рівень сукцинату, інгібує мітохондріальне дихання та має протизапальну дію, зменшуючи продукцію прозапальних цитокінів під час активації макрофагів [5].

Гідрофільні аналоги субстратів, такі як малонат, нітропропіонова кислота (NPA) та оксалоацетат, є низькомолекулярними водорозчинними органічними кислотами, що здійснюють інгібування активного центру SDHA, комплексу II. У рослин NPA функціонує як проміжна сполука в метаболізмі азоту, а також виконує роль захисного агента проти травоядних організмів. Оксалоацетат і малат, будучи проміжними продуктами клітинного метаболізму, опосередковують фізіологічне регулювання

активності СДГ шляхом прямого інгібування оксалоацетатом або потенційно через малат, які утворюються в результаті окиснення фумарату – продукту ферментативної активності СДГ.

Молекули тиноілфторацетату (ТТФА), атпеніну, а також пестициди класу SDHI, специфічно перешкоджають переносу електронів до хінону, діючи на ділянки комплексу II.

Виробництво активних форм кисню за допомогою SDH

У комплексі SDH шлях електрона починається з реакції в SDHA та проходить через кілька стадій, перш ніж досягти акцепторного хінону. Протягом реакційного циклу фермент SDH перебуває в проміжному стані окиснення/відновлення, тобто частково окислюється або відновлюється залежно від швидкості окремих етапів електронного транспорту. Існує ймовірність, що електрони можуть відхилитися від основного шляху, взаємодіючи з альтернативними акцепторами. Якщо один електрон передається кисню, утворюється супероксид, а при перенесенні двох електронів утворюється пероксид водню (H_2O_2), обидва продукти належать до активних форм кисню (АФК). Вважається, що різні інгібітори по-різному впливають на механізм утворення АФК: аналоги субстрату, такі як малонат і NPA, блокують надходження електронів у SDH, що запобігає їх витоку до кисню. Натомість SDHI заважають передачі електронів до хінону, що призводить до накопичення електронів у ферменті та підвищення витоку електронів до кисню, стимулюючи утворення АФК. Крім того, SDH може опосередковано сприяти вивільненню мітохондріальних АФК через взаємодію з іншими елементами дихального ланцюга.

Наслідки пригнічення СДГ

Негативні наслідки дефіциту SDH, спричиненого генетичними мутаціями або дією інгібіторів (наприклад, 3-NP чи малонату), зазвичай пов'язують із порушенням енергетичного обміну.

При повній зупинці роботи SDH цикл трикарбонових кислот (ЦТК) зможе функціонувати лише до утворення сукцинату, при цьому буде

синтезовано два НАДН і одну молекулу АТФ на кожен сукцинат, що еквівалентно приблизно 6,4 молекули АТФ. Проте за такої схеми оксалоацетат буде споживатися як субстрат і швидко вичерпається, що заблокує подальше введення ацетильних залишків у процес окиснення. Як наслідок, припиниться синтез АТФ і НАДН у циклі ЦТК, зупиниться окиснювальний метаболізм і процес окисного фосфорилування (OXPHOS), що призведе до швидкої загибелі клітин [3].

4. Гриби як джерело біологічно активних сполук з терапевтичною активністю

Упродовж останніх десятиліть гриби привертають все більше уваги науковців завдяки своїм різноманітним поживним та лікувальним властивостям. На сьогоднішній день описано близько 110 000 видів грибів, хоча дослідження свідчать, що це лише приблизно 10% усього грибного біорізноманіття планети. Гриби містять широкий спектр біологічно активних сполук з лікувальним потенціалом. З давніх часів гриби, особливо їстівні, високо цінувалися у всьому світі за їхній унікальний смак. Крім того, гриби виконують роль пребіотиків, а приблизно половина їстівних видів вважається функціональною їжею. Сучасні дослідження доводять, що біоактивні компоненти грибів можна використовувати як харчові добавки. Ці речовини поділяються на високомолекулярні полімери (зокрема полісахариди, глікопротеїни, протеоглікани) та вторинні метаболіти, серед яких кислоти, терпеноїди, фенольні сполуки, алкалоїди, лактони, стерини, аналоги нуклеотидів [21].

Вони характеризуються високою поживною цінністю завдяки значному вмісту білка, зокрема незамінних амінокислот, а також клітковини; при цьому мають низький вміст жиру та містять цінні жирні кислоти. Гриби також є хорошим джерелом вітамінів, з високим вмістом рибофлавіну (вітаміну В2), ніацину, фолієвої кислоти, та незначною кількістю вітамінів С, В1, В12, D та Е. Таким чином, вони можуть бути чудовим джерелом багатьох

різних нутрицевтиків і можуть використовуватися безпосередньо в раціоні людини та для зміцнення здоров'я завдяки синергічним ефектам усіх присутніх біоактивних сполук.

Велика різноманітність грибів традиційно використовувалася у багатьох різних культурах для підтримки здоров'я, а також для профілактики та лікування захворювань завдяки їхнім імуномодулюючим та протипухлинним властивостям.

Гриби проявляють понад 100 лікувальних властивостей, серед яких – антиоксидантна, протипухлинна, протидіабетична, протиалергічна, імуномодулююча, серцево-судинна, антихолестеринемічна, протівірусна, антибактеріальна, протипаразитарна, протигрибкова, детоксикаційна та гепатозахисна дія; вони також захищають від розвитку пухлин і запальних процесів.

Збалансоване харчування є допоміжним засобом для профілактики захворювань і особливо проти окиснювального стресу. У цьому контексті гриби мають тривалу історію використання в східній медицині для профілактики та боротьби з численними захворюваннями. В даний час екстракти грибів комерціалізуються як дієтичні добавки через їхні властивості, в основному для підвищення імунної функції та протипухлинної активності [24].

Антиоксидантна дія грибів на печінку

Гриби (і трюфелі) містять різноманітні сполуки з доведеною антиоксидантною дією, починаючи від фенольних сполук (флавоноїди, лігнани, окислені поліфеноли, фенольні кислоти, стильбени та таніни) до каротиноїдів, полісахаридів, білків і пептидів (глутатіон і ерготіонеїн), вітамінів і похідних (аскорбінова кислота, ергостерол та токоферолі), а також мінералів (цинку та селену), серед інших. Зокрема, було показано, що загальний вміст фенолів у їстівних грибах тісно пов'язаний з їхньою антиоксидантною здатністю та здатністю поглинати вільні радикали.

Підвищуючи рівень антиоксидантів у гепатоцитах, гриби можуть полегшити пошкодження, викликане окислювальним стресом.

Кілька досліджень *in vitro* продемонстрували здатність екстрактів грибів із плодових тіл або міцелію протидіяти окиснювальному стресу шляхом поглинання радикалів ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$, H_2O_2 і DPPH), інгібування пероксидного окислення ліпідів, зменшення іонів Fe^{3+} і хелатної активності іонів Fe^{2+} . Таке хелатування іонів Fe , наприклад, що походять від дезорієнтованих кластерів Fe-S ферментів ТСА або білків ЕТС, може безпосередньо знизити вміст АФК на основі реакції Фентона. Таким чином, ці дослідження свідчать про ключову здатність екстрактів грибів протидіяти згубному окиснювальному пошкодженню мітохондрій. Такі висновки демонструють позитивний вплив грибних екстрактів на окиснювальний стрес, але також припускають їх потенційне використання як джерел мінералів або металів. Це може навіть посилити їх терапевтичну антиоксидантну дію, оскільки метали слугують кофакторами антиоксидантних ферментів і є важливими для активності кількох білків ЕТЛ і ферментів ЦТК [7].

Одним із найвідоміших у традиційній східноазіатській медицині є лікарський гриб роду *Hericium*. Таксономічно *Hericium* належить до відділу Basidiomycota, класу Agaricomycetes, порядку Russulales і родини Hericiaceae. Наразі у світі відомо 53 види цього роду. Найчастіше гриби *Hericium* зустрічаються в Японії, Північній Америці та на території Євразії [21].

В останні роки дослідження грибів, що належать до роду *Hericium*, привернули значну увагу завдяки їхньому унікальному зовнішньому вигляду та загальновідомим лікувальним властивостям. Ці гриби багаті біологічно активними хімічними речовинами, такими як полісахариди, геріценони, еринацини, геріцерини, резорцини, стероїди, моно- та дитерпени та коралоцини, а також необхідні поживні речовини. Ці сполуки демонструють корисну біоактивність, пов'язану з різними фізіологічними системами організму, включаючи травну, імунну та нервову системи. Були проведені

численні дослідження із виділення та ідентифікації біологічно активних хімічних речовин, і дослідження *in vitro* та *in vivo* підтвердили їхні антиоксидантні, імуномодулюючі, антихолестеринемічні, протипухлинні та нейропротекторні властивості [14].

Однак, гриб, *Hericium alpestre*, який відрізняється від *Hericium erinaceum* через внутрішні транскрибовані спейсерні послідовності (ITS) рДНК, залишається практично не вивченим. Існує лише декілька робіт, які стосуються вторинних метаболітів, виділених з *H. alpestre*, що свідчить про обмеженість досліджень цього виду перспективного гриба [15].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі досліджували та визначали активність ензимів I та II комплексів дихального ланцюга у печінці тварин з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*. Гриб був наданий національно-природничим парком “Гуцульщина”.

Дослідження проведені на лабораторних статевозрілих білих безпородних щурах, масою 200-220г. Протягом експерименту тварин поміщали в пластмасові клітки з дерев'яною стружкою. Щури мали вільний доступ до питної води та споживали стандартний раціон віварію.

Під час експерименту лабораторних тварин утримували відповідно до правил, прийнятих Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно до «Загальних етичних принципів еспериментів на тваринах», прийнятих на 7-й Національній конференції з біоетики.

Відібрані щури були розділені на 5 груп :

I група – контрольні щури (К);

II група – тварини, яким вводили етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre* (10 днів) у дозі 200 мг/кг (Ех);

III груп – щури, з модельованим токсичним ураженням, яким перорально 1 раз на день, впродовж 2 днів, вводили ацетамінофен (у вигляді 1 % суспензії крохмального гелю) у дозі 1250 мг/кг (АРАР);

IV група – щури, яким вводили етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre* (10 днів) у дозі 200 мг/кг, а на 11-12 день вводили ацетамінофен в тій самій дозі (Ех + АРАР);

V група – щури, яким протягом 2 днів вводили ацетамінофен у дозі 1250 мг/кг, після чого вони отримували етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre* (7 днів) у дозі 500 мг/кг (АРАР + Ех).

У ході експерименту у тварин здійснювали забір крові та органів, а також проводили вимірювання маси тіла й органів.

Виділення мітохондріальної фракції

Виділення фракції мітохондрій із гомогенату печінки проводили методом диференційного центрифугування. Всі етапи проводили при температурі 0–4 °С із використанням попередньо охолоджених інструментів. На першому етапі проводили гомогенізацію печінки. Для цього тканини печінки подрібнювали, після чого гомогенізували до однорідної консистенції у середовищі гомогенізації, що включало 0,25 М сахарози, 0,03 М Трис-НСl, 0,001 М ЕДТА, 7,4 рН. Отриманий гомогенат фільтрували у пробірки для подальшого центрифугування. При швидкості у 1000g протягом 10 хв осаджували ядра та частини клітин, утворений при цьому супернатант відбирали та використовували для подальшого центрифугування при 12000g протягом 10 хв. До утвореного осаду мітохондрій додавали по 5 мл буферу Б, що містить 1 М Трис-НСl, рН 7,4, 0,25 М сахарози. Осад мітохондрій повторно промивали [13].

Вміст білка у зразках визначали за стандартним методом Лоурі.

Приготування етанольного екстракту

Екстракцію плодових тіл гриба *Hericium alpestre*, проводили за методом, запропонованим у Boonsong et al. [2] із певними змінами. Для приготування 70 % етанольного екстракту кожен порошкоподібний зразок змішували з 50 мл 70 % етанолу і струщували при 150 об/хв при кімнатній температурі протягом 24 годин, потім його центрифугували 15 хв при 12000 об/хв. Супернатант фільтрували за допомогою фільтрувального паперу Ватман і збирали фільтрат. Залишок повторно екстрагували за тих же умов. Отриманий екстракт концентрували під вакуумом при 40 °С на роторному випарнику Labfreez RE-2000E. Отриманий зразок зберігався в темному місці при 4 °С. Надалі готували екстракти у дозі 200 та 500 мг/кг.

Визначення НАДН-дегідрогеназної активності

НАДН-дегідрогеназну активність визначали спектрофотометрично в кюветі, що містить 100 мкМ НАДН, 2,9 мл 0,02 М трис-фосфатного буферу

(рН 7,4). У кювету додавали 100 мкл мітохондріальної фракції. Окислення НАДН контролювали за зменшенням поглинання світла при 340 нм.

Визначення сукцинатдегідрогеназної активності

Активність сукцинатдегідрогенази визначали за кількістю відновленого в реакції з сукцинатом ферриціаніду калію. У центрифужні пробірки вносили середовище інкубації: 0,1 М фосфатного буферу (рН 7,8), 0,1 М бурштинової кислоти, 0,1 М ЕДТА, 0,1 М натрію азиду, 0,1 мл H_2O . До проб додавали по 0,2 мг білка суспензії мітохондріальних мембран. Проби інкубували за кімнатної температури впродовж 5 хв для інгібування цитохромоксидази азидом натрію. Реакцію розпочинали додаванням до проб 0,1 мл розчину калію ферриціаніду. Проби інкубували впродовж 10 хв за температури + 30 °С. Після інкубації реакцію зупиняли додаванням 2 мл 20 % ТХО і знижували температуру проб до 0 °С шляхом опускання проб у лід. У контрольні проби, які містять всі компоненти інкубаційної суміші, ТХО додавали перед внесенням суспензії мітохондрій. Проби центрифугували 15 хв при 2000 об/хв для осадження білка. Прозору надосадову рідину фотометрували на спектрофотетрі СФ-46 за довжини хвилі 420 нм [13].

Активність ферменту розраховували за калібрувальним графіком.

Статистичний аналіз даних

Обробка результатів дослідження була проведена за допомогою табличного редактора «Microsoft Office Excel». Були внесені показники кожної групи, обраховували середнє арифметичне значення і середнє квадратичне відхилення. На основі даних показників будувалися графіки.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою методу варіаційної статистики з використанням критерію Стюдента (t). Статистично достовірною різниця між групами вважалась при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ацетамінофен – популярний знеболювальний та жарознижувальний засіб, який широко застосовується як у рецептурних, так і в безрецептурних лікарських препаратах. Попри його ефективність у лікуванні болю, передозування АРАР може спричинити серйозні ураження печінки, які в окремих випадках можуть мати летальні наслідки.

Експериментальні дослідження на тваринах, зокрема на мишах і щурах, мають важливе значення для вивчення фармакологічних властивостей та токсичності ацетамінофену [22]. Цей препарат часто використовується як модельний агент для відтворення гепатотоксичних станів. Ступінь пошкодження гепатоцитів та їхня здатність до регенерації при такому ураженні тісно пов'язані з енергетичним забезпеченням клітин, що значною мірою залежить від ефективності функціонування мітохондріального дихального ланцюга. У цьому процесі ключову роль відіграють ферменти I комплексу (НАДН-дегідрогеназа) та II комплексу (сукцинатдегідрогеназа).

Результати проведених досліджень показали, що у тварин, яким перорально вводили АРАР у дозі 1250 мг/кг, спостерігається достовірне зниження активності ферменту НАДН-дегідрогенази (рис. 1), що може бути зумовлено ушкодженням ензиму за дії активних форм кисню або утворенням аддуктів з метаболітом ацетамінофену NAPQI (N-ацетил-*p*-бензохіноніміном). Відомо, що NAPQI призводить до виснаження глутатіону (GSH), після чого сполука починає взаємодіяти з клітинними білками, зв'язуючись із їхніми цистеїновими залишками та формуючи білкові аддукти, що стимулює надмірне утворення супероксидних радикалів. Ці радикали можуть вступати в реакцію з оксидом азоту з утворенням сильного окисника – пероксинітриту [1]. Унаслідок цього основними мішенями стають мітохондріальні білки та іонні канали, що зумовлює порушення енергетичного метаболізму, іонного балансу, погіршується функціонування

дихального ланцюга, знижується синтез АТФ, порушується активність мітохондрій, що врешті-решт призводить до загибелі клітин [1,18].

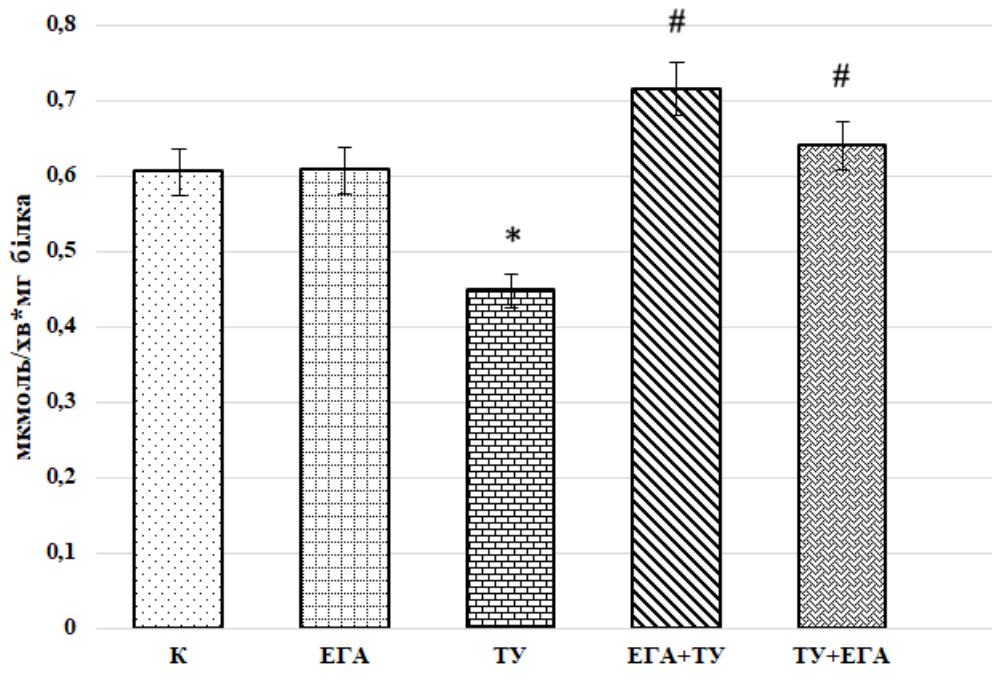


Рис. 1. НАДН-дегідрогеназна активність у мітохондріях печінки з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*

Примітка (тут і надалі): К – контроль; ЕГА – тварини, які отримували екстракт *Hericium alpestre* 10 днів у дозі 200 мг/кг; ТУ – тварини, які отримували токсичну дозу ацетамінофену (1250 мг/кг); ЕГА+ТУ – тварини, яким вводили екстракт у дозі 200 мг/кг + токсичне ураження; ТУ+ЕГА – тварини з токсичним ураженням + екстракт 7 днів у дозі 500 мг/кг. * - статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $p < 0,05$. # - статистично достовірна різниця порівняно з групою ТУ, $p < 0,05$.

Водночас за досліджуваних експериментальних умов сукцинатдегідрогеназна активність також знижується (рис. 2). Ймовірно, отриманий факт також пов'язаний з утворенням токсичного метаболіту ацетамінофену, який здатен порушувати цілісність мітохондріальних мембран і структурну організацію білкових комплексів дихального ланцюга, зокрема комплексу II [26]. Це, у свою чергу, може супроводжуватися зниженням синтезу АТФ та активацією вільнорадикальних процесів, що

додатково поглиблює дисфункцію ферментативних систем. У зв'язку з цим, актуальним є питання пошуку природніх сполук з антиоксидантними властивостями, які потенційно можуть знижувати прояви оксидативного стресу та підтримувати енергетичне забезпечення клітин печінки.

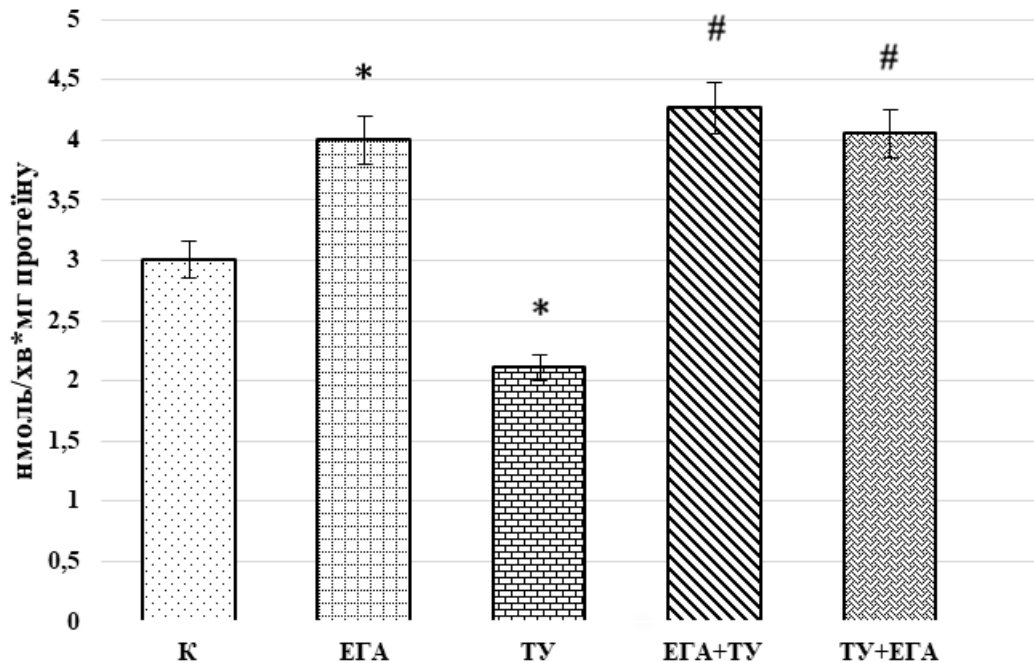


Рис. 2. Сукцинатдегідрогеназна активність у мітохондріях печінки з ацетамінофен-індукованою токсичністю за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*

Гриби, які з давніх часів цінувалися за свої смакові якості та поживну цінність, сьогодні привертають усе більше уваги завдяки своїм численним лікувальним властивостям. Їх використовують не лише як продукти харчування, а й як джерело нутрицевтиків, харчових добавок та засобів мікотерапії [25]. Вони містять багато необхідних для організму речовин, зокрема селен, калій, рибофлавін, ніацин, вітамін D, білки й клітковину. Завдяки високому вмісту біологічно активних речовин, грибні екстракти активно використовуються для зміцнення здоров'я людини та часто входять до складу різноманітних харчових добавок [24]. Зростаючий інтерес до природніх засобів, зокрема як доповнення до традиційної медицини, стимулював зростання наукових досліджень, які зосереджені на виявленні, аналізі та вивченні мікохімічних сполук і механізмів їхньої дії. Значна

кількість наукових робіт присвячена вивченню біологічної активності грибних метаболітів, що свідчить про їхній великий потенціал у сфері медицини [25]. Останнім часом гриби роду *Hericium* привертають увагу завдяки незвичному вигляду та лікувальним властивостям. Вони містять багато біоактивних сполук, що впливають на імунну, нервову та травну системи. Водночас *Hericium alpestre* залишається недостатньо вивченим, наразі є лише кілька публікацій про його вторинні метаболіти, що підкреслює необхідність глибшого дослідження цього перспективного виду [14]. З огляду на наявність біоактивних компонентів, *H. alpestre* може мати потенціал як засіб для корекції токсичних уражень печінки, зокрема таких, що індуковані ацетамінофеном.

Результати проведених досліджень показали, що введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* протягом 10 днів у дозі 200 мг/кг не призводить до змін активності ферменту НАДН-дегідрогенази у порівнянні з контрольною групою (рис. 1), проте спостерігається незначне підвищення сукцинатдегідрогеназної активності (рис. 2). Водночас нами встановлено, що попереднє введення екстракту у дозі 200 мг/кг впродовж 10 днів перед введенням токсичних доз ацетамінофену призводить до підвищення НАДН-дегідрогеназної активності (рис. 1). Аналогічна тенденція характерна для змін сукцинатдегідрогеназної активності (рис. 2). Слід відмітити, що введення екстракту протягом 7 днів у дозі 500 мг/кг після моделювання токсичного ураження ацетамінофеном також призводить до підвищення ензиматичних активностей I та II комплексів дихального ланцюга. Отримані результати можуть свідчити про активацію процесів енергозабезпечення у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном за умов введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*. Встановлені нами біохімічні зміни можуть мати позитивний ефект для підтримки функціональної активності клітин печінки. Отримані результати вказують на перспективність подальшого дослідження механізмів впливу біологічно активних сполук екстрактів *Hericium alpestre* на функціонування ензимів дихального ланцюга.

ВИСНОВКИ

1. Результати проведених досліджень показали, що у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном спостерігається достовірне зниження ензиматичної активності НАДН-дегідрогенази (компонента I комплексу) та сукцинатдегідрогенази (компонента II комплексу дихального ланцюга).

2. Встановлено, що попереднє введення екстракту *Hericium alpestre* у дозі 200 мг/кг впродовж 10 днів перед введенням токсичних доз ацетамінофену призводить до підвищення НАДН-дегідрогеназної та сукцинатдегідрогеназної активності порівняно з тваринами з інтоксикацією ацетамінофеном, які не отримували екстракт. Аналогічний ефект спостерігається при введенні етанольного екстракту досліджуваного гриба у дозі 500 мг/кг протягом 7 днів після моделювання токсичного ураження ацетамінофеном.

Отримані результати вказують на перспективність подальшого дослідження механізмів впливу біологічно активних сполук екстрактів *Hericium alpestre* на функціонування ензимів дихального ланцюга.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abdel-Daim M., Abushouk A. I., Reggi R., Yarla N. S., Palmery M., Peluso, I. Association of antioxidant nutraceuticals and acetaminophen (paracetamol): Friend or foe?. *Journal of food and drug analysis*. 2018. Vol. 26(2S). P. S78–S87.
2. Boonsong S., Wanwimol K., Pongtep W. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources*. 2016. Vol. 50(2). P. 89-97.
3. Bouillaud F. Inhibition of Succinate Dehydrogenase by Pesticides (SDHIs) and Energy Metabolism. *International journal of molecular sciences*. 2023. Vol. 24(4). P. 4045.
4. Chiew A. L., Gluud C., Brok J., Buckley N. A. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2018. Vol. 2(2). P. CD003328.
5. Dalla Pozza, E., Dando I., Pacchiana R., Liboi E., Scupoli M. T., Donadelli M., Palmieri M. Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. *Seminars in cell and developmental biology*. 2020. Vol. 98. P. 4–14.
6. Du Z., Zhou X., Lai Y., Xu J., Zhang Y., Zhou S., Feng Z., Yu L., Tang Y., Wang W., Yu L., Tian C., Ran T., Chen H., Guddat L. W., Liu F., Gao Y., Rao Z., Gong H. Structure of the human respiratory complex II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2023. Vol. 120(18). P. e2216713120.
7. 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.
8. Formosa L. E., Dibley M. G., Stroud D. A., Ryan M. T. Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Seminars in cell and developmental biology*. 2018. Vol. 76. P. 154–162.

9. Guo R., Gu J., Zong S., Wu M., Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomedical journal*. 2018. Vol. 41(1). P. 9–20.
10. Hayward K. L., Powell E. E., Irvine K. M., Martin J. H. Can paracetamol (acetaminophen) be administered to patients with liver impairment?. *British journal of clinical pharmacology*. 2016. Vol. 81(2). P. 210–222.
11. Jaeschke H. Emerging novel therapies against paracetamol (acetaminophen) hepatotoxicity. *EBioMedicine*. 2019. Vol. 46. P. 9–10.
12. Karavaeva V., Sousa F. L. Modular structure of complex II: An evolutionary perspective. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*. 2023. Vol. 1864(1). P. 148916.
13. Kladnytska L.V., Mazurkevych A. Y., Tomchuk V. A., Garmanchuk L. V., Maluk M.O., Kalachnyk L.G., Velychko S.V., Lozova O.V., Danilov V.B., Kharkevych Iu.O., Tkachenko T.A., Bokotco R.R., Shelest D.A. The effect of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation on the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase in the liver of recipient animals. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*. 2019. Vol. 9(3). P. 4–13.
14. Kostanda E, Musa S, Pereman I. Unveiling the Chemical Composition and Biofunctionality of *Herichium* spp. Fungi: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25(11). P. 5949.
15. Li L. N., Wang L., Guo X. L. Chemical constituents from the culture of the fungus *Herichium alpestre*. *Journal of Asian natural products research*. 2019. Vol. 21(8). P. 735–741.
16. Lobo-Jarne T., Ugalde C. Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Seminars in cell and developmental biology*. 2018. Vol. 76. P. 179–190.
17. Luo, G., Huang, L., Zhang, Z. The molecular mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity and its potential therapeutic targets. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. 2023. Vol. 248(5). P. 412–424.

18. Mazaleuskaya L. L., Sangkuhl K., Thorn C. F., FitzGerald G. A., Altman R. B., Klein T. E. PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenetics and genomics*. 2015. Vol. 25(8). P. 416–426.
19. Mwangi R. W., Macharia J. M., Wagara I. N., Bence R. L. The antioxidant potential of different edible and medicinal mushrooms. *Biomedicine and pharmacotherapy*. 2022. Vol. 147. P. 112621.
20. Sánchez-Caballero L., Guerrero-Castillo S., Nijtmans L. Unraveling the complexity of mitochondrial complex I assembly: A dynamic process. *Biochimica et biophysica acta*. 2016. Vol. 1857(7). P. 980–990.
21. Tabibzadeh F., Alvandi H., Hatamian-Zarmi A., Kalitukha L., Aghajani H., Ebrahimi-Hosseinzadeh B. Antioxidant activity and cytotoxicity of exopolysaccharide from mushroom *Herichium coralloides* in submerged fermentation. *Biomass conversion and biorefinery*. 2022. Vol. 14. P. 26953–26963.
22. Taguchi K., Tokuno M., Yamasaki K., Kadowaki D., Seo H., Otagiri M. Establishment of a model of acetaminophen-induced hepatotoxicity in different weekly-aged ICR mice. *Laboratory animals*. 2015. Vol. 49(4). P. 294–301.
23. Tretter L., Patocs A., Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2016. Vol. 1857 (8). P. 1086–1101.
24. Valverde M. E., Hernández-Pérez T., Paredes-López O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International journal of microbiology*. 2015. Vol. 376387.
25. Venturella G., Ferraro V., Cirilincione F., Gargano M. L. Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. *International journal of molecular sciences*. 2021. Vol. 22(2). P. 634.
26. 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.

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 потрапляння 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 тільки призначеною для цього 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 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 до 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 більше 5°C рекомендується багаторазово прополоскати наконечники;
- ✓ після закінчення роботи слід помістити піпетку в штативі.