

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

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

**Активність NAD^+ -залежних ензимів циклу Кребса в мітохондріях
печінки щурів за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*
та передозування ацетамінофеном**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 групи
спеціальності 091 Біологія

Ковальчук Кароліна Анатоліївна

Керівник:

к.б.н., доцент **Волощук О.М.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри біохімії та біотехнології
протокол № _____ від _____ 2025 р.
Зав. кафедрою _____ к.б.н., доцент Волощук О.М.

Чернівці – 2025

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню активності NAD^+ -залежних ензимів циклу Кребса в мітохондріях печінки щурів за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpestre* та токсичного ураження ацетамінофеном.

Встановлено, що токсичне ураження печінки ацетамінофеном у дозі 1250 мг/кг протягом двох днів призводить до статистично значущого зниження активності ізоцитратдегідрогенази та α -кетоглутаратдегідрогенази при збереженні активності малатдегідрогенази на рівні показників контролю. Водночас профілактичне введення етанольного екстракту *Hericium alpestre* у дозі 200 мг/кг протягом 10 днів перед токсичним ураженням супроводжується відновленням ензиматичних активностей α -кетоглутаратдегідрогенази та ізоцитратдегідрогенази до контрольних значень. У той же час застосування спиртового екстракту гриба *Hericium alpestre* у дозі 500 мг/кг протягом 7 днів після токсичного ураження індукує виражене підвищення активностей усіх NAD^+ -залежних ензимів циклу Кребса, що свідчить про позитивний ефект біологічно-активних сполук екстракту на стан системи енергозабезпечення клітин печінки за умов ураження ацетамінофеном.

Отримані результати вказують на здатність спиртового екстракту плодових тіл гриба *Hericium alpestre* забезпечувати активацію NAD^+ -залежних ензимів циклу Кребса за умов ацетамінофен-індукованого токсичного ураження печінки, що свідчить про перспективність подальшого дослідження механізмів його біологічної активності.

Ключові слова: печінка, мітохондрії, ацетамінофен, екстракт *Hericium alpestre*, цикл Кребса, NAD^+ -залежні ензими

ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to the study of the activity of NAD⁺-dependent enzymes of the Krebs cycle in rat liver mitochondria under conditions of ethanol extract of *Hericium alpestre* and acetaminophen toxicity.

It was found that toxic liver damage by acetaminophen at a dose of 1250 mg/kg for two days leads to a statistically significant decrease in the activity of isocitrate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase while maintaining the activity of malate dehydrogenase at the level of control values. At the same time, the prophylactic administration of ethanol extract of *Hericium alpestre* at a dose of 200 mg/kg for 10 days before toxic injury is accompanied by the restoration of the enzymatic activities of α -ketoglutarate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase to control values. At the same time, the use of an alcoholic extract of the fungus *Hericium alpestre* at a dose of 500 mg/kg for 7 days after toxic injury induces a marked increase in the activities of all NAD⁺-dependent enzymes of the Krebs cycle, which indicates a positive effect of the extract's biologically active compounds on the state of the liver cell energy supply system under conditions of acetaminophen damage.

The results obtained indicate the ability of the alcohol extract of the fruiting bodies of the fungus *Hericium alpestre* to provide activation of NAD⁺-dependent enzymes of the Krebs cycle under conditions of acetaminophen-induced toxic liver damage, which indicates the prospects for further study of the mechanisms of its biological activity.

Keywords: liver, mitochondria, acetaminophen, *Hericium alpestre* extract, Krebs cycle, NAD⁺-dependent enzymes

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

_____ К.А. Ковальчук

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Механізми ушкоджуючої дії ацетамінофену.....	7
1.1.1. Шляхи метаболізму ацетамінофену в печінці.....	7
1.1.2. Молекулярні механізми гепатотоксичності ацетамінофену.....	10
1.2. Сучасні уявлення про будову та функціонування ензимів циклу Кребса.....	17
1.2.1. Структурно-функціональні особливості NAD ⁺ -залежних ензимів.....	18
1.3. Гриби як потенційне джерело сполук із гепатопротекторними властивостями	22
1.3.1. Загальна характеристика лікарських грибів та перспективи їх використання	22
1.3.2. Рід <i>Hericium</i> : ботанічна характеристика, поширення, біологічно активні сполуки та гепатопротекторні властивості	23
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	26
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	30
ВИСНОВКИ	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	36
ДОДАТКИ.....	44

ВСТУП

Проблема токсичного ураження печінки, спричиненого лікарськими засобами, залишається однією з найбільш актуальних у сучасній медицині. Серед препаратів, що найчастіше спричиняють медикаментозне ураження печінки, особливе місце займає ацетамінофен (парацетамол). Він є широко вживаним нестероїдним протизапальним та жарознижувальним препаратом. Статистика свідчить, що передозування ацетамінофеном є провідною причиною гострої печінкової недостатності у США та багатьох західних країнах, з летальністю близько 0,4%, що становить приблизно 300 смертельних випадків щороку [1].

На сьогодні актуальним є питання пошуку природних джерел речовин, що здатні корегувати метаболічні порушення при токсичному ураженні печінки. Перспективним джерелом таких сполук на сьогодні розглядаються гриби. Впродовж століть людство використовувало гриби як харчові продукти, що володіють профілактичними та лікувальними властивостями [2]. Відомо, що гриби містять такі біологічно активні компоненти як полісахариди, зокрема β -глюкан, поліфеноли, терпени, вітаміни та мінерали [3]. Низка наукових досліджень показує, що гриби проявляють різноманітну біологічну активність, включаючи антиоксидантні, протизапальні, антимікробні, гепатопротекторні та антидіабетичні ефекти. Завдяки даним властивостям, гриби останніми роками викликають зростаючий науковий інтерес та мають потенціал для розробки функціональних харчових продуктів або фармацевтичних препаратів, спрямованих на профілактику та терапію різних хронічних патологічних станів, таких як онкологічні захворювання, патології серцево-судинної системи, цукровий діабет та нейродегенеративні розлади [4].

Особливу увагу серед лікарських грибів привертають представники роду *Hericium*. Численні дослідження підтвердили, що різноманітні біоактивні речовини, виділені з цих грибів, здатні стимулювати імунну відповідь. У літературі описано різноманітні групи біологічно активних вторинних метаболітів *Hericium*: фенольні сполуки, поліпептиди, терпенові похідні,

полісахариди, ліпополісахариди, глікопротеїни, а також пірони, алкалоїди, терпеноїди, стероїди та нерибосомні пептиди [5]. В порівнянні з достатньо вивченим і відомим своїми нейропротекторними властивостями грибом *Hericiium erinaceus* [6], гриб *Hericiium alpestre* та його біологічна активність залишається мало дослідженою.

Попередні дослідження, проведені на кафедрі, показали, що екстракт *Hericiium alpestre* проявляє виражену антиоксидантну активність у системі *in vitro*. Оскільки одним із механізмів токсичної дії ацетамінофену є його здатність індукувати вільнорадикальні процеси та порушувати функціональну активність мітохондрій, актуальним є дослідження впливу екстракту даного гриба на функціональний стан мітохондрій та активність NAD^+ -залежних ензимів циклу Кребса за умов токсичного ураження печінки ацетамінофеном.

Метою роботи було вивчення активності NAD^+ -залежних ензимів циклу Кребса у мітохондріях печінки щурів за умов введення етанольного екстракту *Hericiium alpestre* та токсичного ураження, спричиненого ацетамінофеном.

Для досягнення поставленої мети було визначено такі **завдання**:

1. Дослідити активність ізоцитратдегідрогенази у мітохондріях печінки щурів за умов введення етанольного екстракту гриба *Hericiium alpestre* та токсичного ураження ацетамінофеном.

2. Визначити α -кетоглутаратдегідрогеназну активність у мітохондріях печінки щурів за умов введення екстракту гриба та ацетамінофен-індукованого токсичного ураження.

3. Визначити малатдегідрогеназну активність за умов токсичного ураження печінки ацетамінофеном та введення спиртового екстракту *Hericiium alpestre*.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізми ушкоджуючої дії ацетамінофену

Ацетамінофен (інші назви АРАР, парацетамол) є популярним, часто застосовуваним нестероїдним протизапальним, жарознижувальним та знеболюючим препаратом. Статистика використання парацетамолу в Сполучених Штатах показує, що на рік мешканцями використовується близько 300 мільйонів ліків (як рецептурні так і безрецептурні), що містять АРАР або АРАР, у різних формулах. Згідно з рекомендаціями Управління із санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США, максимально дозволена доза для осіб віком від 13 років становить 1000 мг при одноразовому застосуванні та не повинна перевищувати 4000 мг протягом доби. У випадку пацієнтів віком від 2 до 12 років, необхідно коригувати дозування з урахуванням метаболічних особливостей дитячого організму, базуючись на показниках віку або маси тіла дитини [1]. АРАР пов'язують зі значною кількістю випадків отруєння та токсичним ураженням печінки.

1.1.1. Шляхи метаболізму ацетамінофену в печінці

Ацетамінофен вперше описаний у 1878 році [7]. Даний препарат має і інші часто використовуванні назви, такі як: парацетамол, АРАР, панадол, N-ацетил-*p*-амінофенол. Він являє собою тверду кристалічну речовину без специфічного запаху та з характерним білим забарвленням. Має неприємний гіркий смак.

Парацетамол є представником класу фенолів, а саме похідних 4-амінофенолу, де один атом водню аміногрупи заміщений ацетильною групою (рис. 1.1). Цей препарат діє як інгібітор циклооксигеназ (типів 1, 2 та 3), належить до ненаркотичних анальгетиків, проявляє жарознижувальну та протизапальну активність. Крім медичного застосування, АРАР виконує роль ксенобіотика та є потенційним забруднювачем повітря. У людському організмі він функціонує як метаболіт сироватки крові, має гепатотоксичні властивості та здатен індукувати ферроптоз [8].

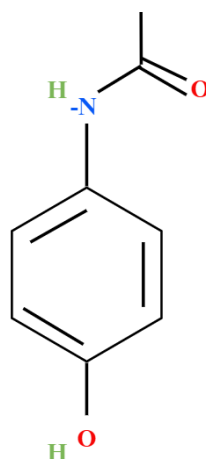


Рис. 1.1. Хімічна структура ацетамінофену [8]

АРАР все ще залишається актуальним об'єктом досліджень не тільки як терапевтичний засіб, а й гепатотоксин, так як здатний уражати печінку при передозуванні. В ранніх дослідженнях ацетамінофену було встановлено, що токсичними є його метаболіти, а не сам лікарський засіб. Також відмітили, що токсичними є високі дози парацетамолу, проте спостерігається видова відмінність щодо чутливості до препарату [7].

При пероральному прийомі парацетамолу його абсорбція відбувається переважно через механізм пасивного транспорту, забезпечуючи високу, хоча й не постійну, біодоступність препарату. Відомо, що ацетамінофен метаболізується в печінці, шляхом глюкоронідації та сульфатації з утворенням нетоксичних кон'югатів (рис. 1.2). Дані шляхи є основними процесами метаболізму АРАР [9].

Процес глюкоронідації забезпечується роботою ензимів УДФ-глюкороносилтрансфераз (UGT). Їх роль полягає в тому, що дані ферменти здатні транспортувати глікозильну групу уридин-5'-дифосфо-глюкоронової кислоти на молекули мішені, в результаті чого вони стають більш водорозчинними. В організмі людей та гризунів було описано ряд UGT, що відносять то чотирьох сімейств, а саме: UGT1, UGT2, UGT3 і UGT8 [10].

Натомість сульфатація забезпечує біотрансформацію ксенобіотиків, зокрема лікарських засобів в організмі людини та інших ссавців. Сульфатну кон'югацію каталізують цитозольні сульфотрансферази (SULTs). Під час

SULT-опосередкованих реакцій відбувається перенесення сульфонатної групи з активного сульфату (3'-фосфоаденозин-5'-фосфату, PARS) на субстрат, що містить гідроксильну або аміногрупу. Процес сульфатації сприяє інактивації субстратних сполук та/або їх елімінації з організму. Людський організм містить тринадцять різних SULTs, розподілених між чотирма генними родинами: SULT1, SULT2, SULT4 і SULT6. Численні дослідження показали, що деякі представники цих родин, зокрема SULT1A1 і SULT1A3, можуть здійснювати сульфатацію ацетамінофену [11].

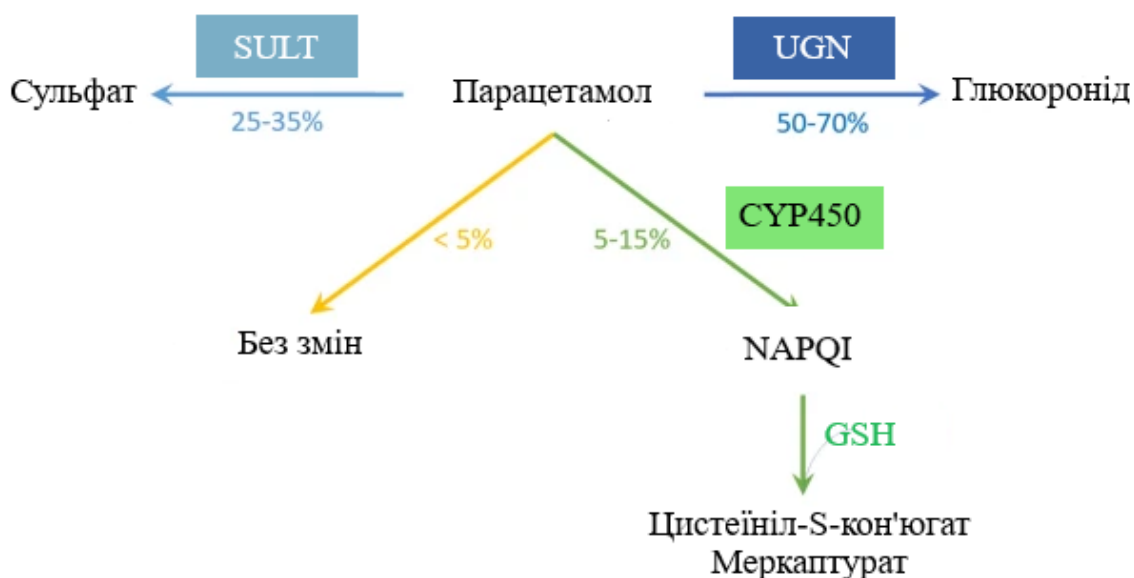


Рис. 1.2. Шляхи метаболізму ацетамінофену в печінці [11]

Проте незначна частина препарату підлягає окисленню за участю ферментів системи цитохрому P450 (рис. 1.2), в результаті чого утворюється високотоксичний метаболіт N-ацетил-*p*-бензохінонімін (NAPQI). За нормальних фізіологічних умов детоксикація NAPQI здійснюється шляхом кон'югації з глутатіоном, утворюючи цистеїнові та меркаптуратові кон'югати, які згодом будуть виводитися із організму нирками. У випадку дефіциту глутатіону або при його виснаженні внаслідок передозування ацетамінофеном, NAPQI вступає в реакцію з клітинними мембранними структурами, що призводить до розвитку гострого некрозу печінкової тканини [9].

1.1.2. Молекулярні механізми гепатотоксичності ацетамінофену

У клінічній практиці часто зустрічається гепатотоксичність, спричинена лікарськими засобами (DILI), що пояснюється метаболізмом численних сполук, включаючи фітопрепарати та альтернативні лікарські засоби, у мікросомах печінки. Найнебезпечнішим клінічним проявом вважається фульмінальна печінкова недостатність, яка характеризується розвитком печінкової енцефалопатії та коагулопатії перед появою жовтяниці у пацієнтів без попередньої історії печінкових захворювань.

Перші задокументовані випадки гепатотоксичності, спричинені ацетамінофеном (APAP), були зафіксовані в США в середині 80-х років, після чого спостерігається тенденція до зростання частоти таких випадків. За даними досліджень, цей препарат визнано одним із найчастіших фармацевтичних засобів, що спричиняють медикаментозне ураження печінки (DILI). Рівень летальних випадків при передозуванні APAP становить приблизно 0,4%, що відповідає 300 смертельним випадкам щороку в Сполучених Штатах. Традиційно вважалося, що токсичний вплив на печінку за перорального прийому ацетамінофену виникає при дозах понад 150 мг/кг. Проте зараз з'являється все більше свідчень про можливість розвитку гострого ураження печінки та печінкової недостатності при нижчих дозах парацетамолу. Концепція «терапевтичної пригоди», запропонована *Zimmerman et al.*, набуває більш ширшого визнання, оскільки у певних пацієнтів розвивається гостра печінкова недостатність навіть при прийомі доз APAP, що вважаються безпечними. Припускається, що у таких пацієнтів можуть бути специфічні фактори ризику, пов'язані з особливостями метаболізму APAP на мітохондріальному та молекулярному рівнях, які наразі досліджуються з метою з'ясування їхньої ролі у розвитку цього небезпечного для життя стану [12].

Як уже згадувалося вище, основними шляхами метаболізму ацетамінофену є глюкоронідація та сульфатація. Проте на метаболізм ацетамінофену можуть впливати стани, що змінюють рівень глутатіону в

організмі. Такі фактори як ожиріння, стеатоз печінки та різні форми недостатнього харчування призводять до зниження рівня глутатіону (GSH), що підвищує ризик ураження печінки, викликаного ацетамінофеном. За умов тривалого голодування відбувається зміщення метаболічних шляхів АРАР від глюкоронідації до окислювального перетворення. Це пояснюється тим, що під час голодування печінковий метаболізм переорієнтовується на глюконеогенез, через що зменшується доступність попередників глюкози для процесу глюкоронідації. Одночасно посилюється окиснення ацетамінофену внаслідок активації ізоформ цитохрому Р450, які збільшують продукцію токсичного метаболіту NAPQI з парацетамолу. Дослідження підтверджують, що стан голодування посилює токсичний вплив ацетамінофену на печінку, як при одноразовому передозуванні, так і при багаторазовому прийомі малих доз препарату [13].

Кон'югація NAPQI з глутатіоном може реалізовуватися двома шляхами: спонтанно та через ензиматичну реакцію за участі глутатіон-S-трансфераз (GSTs) [13]. Неферментативний процес призводить до утворення трьох сполук: кон'югату 3-(глутатіон-S-іл)-ацетамінофену (APAP-GSH), відновленого вільного АРАР та окисленого дисульфіді глутатіону (GSSG). При ферментативній реакції за участі глутатіонтрансферази формується лише вільний АРАР та APAP-GSH. Цитозольні глутатіонтрансферази людини представлені сімома класами ферментів із численними генетичними варіаціями в кожному класі [14].

Дослідження *in vitro* з використанням ізольованих GST печінки та плаценти людини виявили, що глутатіон-S-трансфераза P1 (GSTP1) найефективніше каталізує кон'югацію NAPQI з глутатіоном, після нього за ефективністю йдуть глутатіон-S-трансфераза T1 (GSTT1) та глутатіон-S-трансфераза M1 (GSTM1). Підвищення концентрації глутатіонтрансферази у плазмі крові корелює з гепатотоксичністю ацетамінофену і розглядається як чутливий ранній індикатор гострого ураження печінки. На відмінну від аланін-та аспартатамінотрансфераз, глутатіонамінотрансфераза швидко

вивільняється як із цетрілобулярних, так із перипортальних гепатоцитів після передозування ацетамінофеном. Аномальні рівні глутатіонтрансфераз у плазмі виявляються вже через 4 години після отруєння АРАР і залишаються підвищеними протягом 12 годин після прийому препарату [13].

Встановлено, що переважна частина АРАР-GSH піддається розщепленню до кон'югатів з меркаптуровою кислотою та цистеїном. Утворені в результаті цього процесу аддукти АРАР-N-ацетилцистеїн (АРАР-НАС), АРАР-цистеїн (АРАР-cys) та АРАР-білок – можуть визначатися в плазмі крові та сечі як непрямі маркери утворення N-ацетил-*p*-бензохіноніміну. Незначна частина ацетамінофену (менше 5%) виводиться з організму у незмінному вигляді.

Існує гіпотеза, що швидко діагностику передозування АРАР можна здійснити через визначення аддуктів АРАР-цистеїну у сироватці крові пацієнтів різних вікових груп – як дорослих, так і дітей [15]. Проте деякі аспекти часової динаміки та механізмів вивільнення цих аддуктів залишаються недостатньо вивченими на людях. Дослідження часової динаміки на мишах демонструють, що рівень АРАР-білкових аддуктів у кровообігу стрімко підвищується після введення парацетамолу, досягаючи максимуму ще до появи ознак ураження печінки [16].

Також відомо, що гепатотоксичність, спричинена ацетамінофеном, призводить до розвитку оксидативного стресу (рис. 1.3) [17]. До розвитку окисного стресу можуть призводити ферменти цитохрому Р450, а також процеси, що відбуваються в мітохондріях під час прийому ацетамінофену. Ідею щодо розвитку окисного стресу після передозування парацетамолом вперше було висунуто наприкінці 1970-х років, коли дослідники виявили, що миші виділяють продукти пероксидного окислення ліпідів, такі як етан і пентан. На той час було уже відомо, що мікросомальні ферменти цитохрому Р450 у системі *in vitro* здатні продукувати супероксид та пероксид водню, що і призвело до розвитку гіпотези про те, що оксидативний стрес розвивається під час метаболізму АРАР. Подальші експерименти підтримали дану концепцію,

демонструючи зниження пероксидного окислення ліпідів і захист від гепатотоксичності АРАР при застосуванні інгібіторів Р450, тоді як його індуктори спричиняли протилежний ефект [18].

Пізніше дослідження ідентифікували Сур2Е1 як основний фермент Р450, залучений до окислювального метаболізму ацетамінофену [18], який також бере участь у метаболізмі етанолу та був постульований як головне джерело активних форм кисню (АФК) при ураженнях печінки, спричинених етанолом [19]. Було продемонстровано як витік АФК під час метаболізму етанолу, так і індукцію експресії Сур2Е1 етанолом із наступним утворенням АФК шляхом розщеплення [19]. На основі такого розуміння етанольної токсичності було висунуто припущення про відповідальність Сур2Е1-залежного метаболізму АРАР за оксидативний стрес [18]. Однак дослідження швидко виявили, що Р450-залежний метаболізм АРАР не є основним джерелом генерування АФК, як початково припускалося. Натомість було встановлено, що утворення АФК відбувається селективно в мітохондріях після початкової фази метаболізму АРАР [20].

У процесі метаболізму ацетамінофену формується реактивний інтермедіат NAPQI, який утворює аддукти білка з білками та ініціює мітохондріальний окиснювальний стрес. Посилена генерація супероксиду, переважно в мітохондріальному електронтранспортному ланцюзі, та його взаємодія з оксидом азоту призводить до утворення пероксинітриду. Супероксид може бути нейтралізованим супероксиддисмутазою 2 (SOD2) з утворенням пероксиду водню, хоча цей процес може бути порушений внаслідок нітрування супероксиддисмутази 2 пероксинітридом. Мітохондріальний оксидативний стрес та пероксид водню активує MAP-кіназу JNK різними шляхами, що спричиняє її фосфорилування і транслокацію до мітохондрій. Це у свою чергу посилює окиснювальний стрес мітохондрій, що призводить до активації мітохондріальної пори перехідної проникності та переміщення мітохондріальних білків, зокрема фактора індукції апоптозу і

ендонуклеази G, до ядра. Кінцевим результатом цих процесів є фрагментація ДНК та розвиток онкотичного некрозу (рис. 1.3) [20].

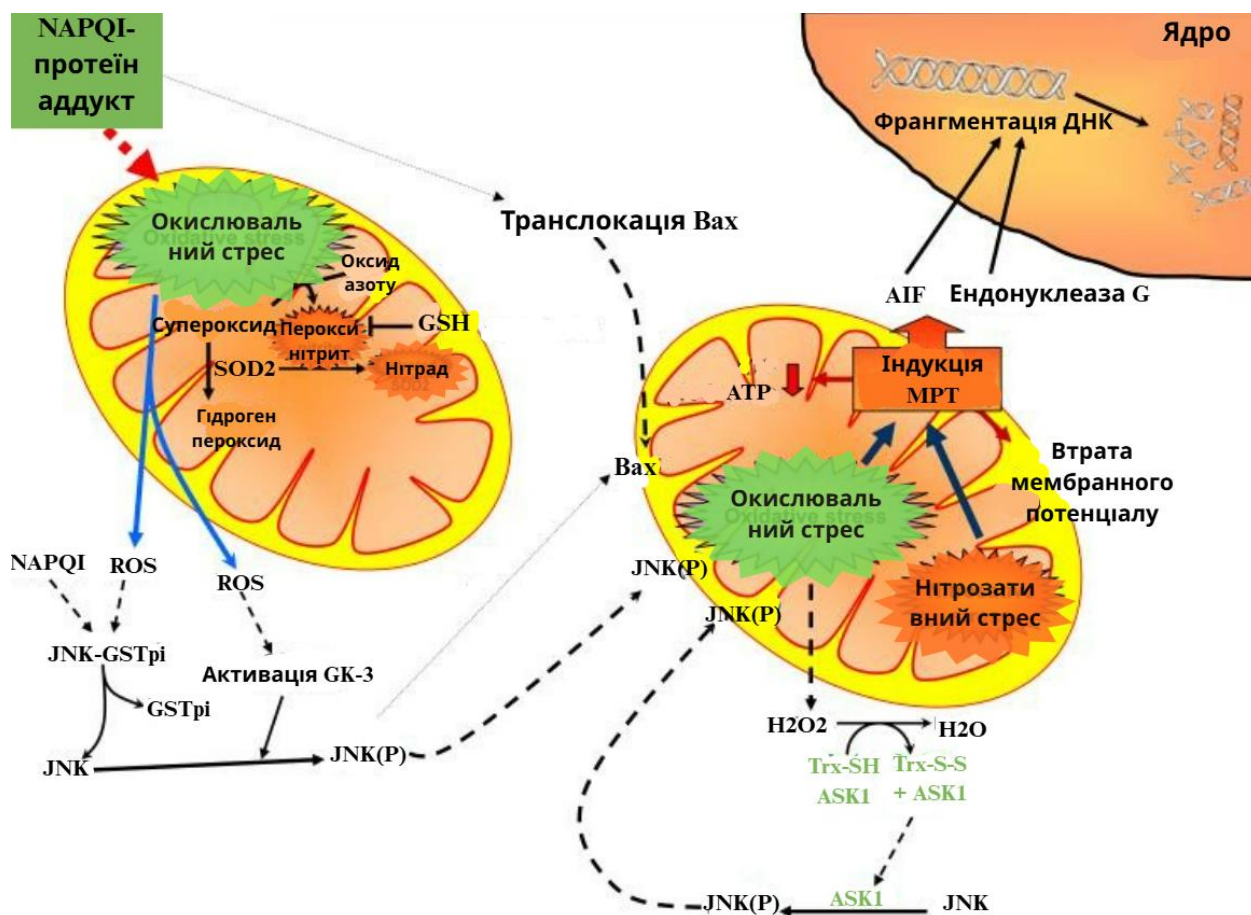


Рис. 1.3. Мітохондріальне окислення, спричинене APAP, та його вплив на клітинну сигналізацію [20]

Мітохондрії – субклітинні структури з подвійною мембраною, традиційно відомі як енергетичні еукаріотичні клітини, що синтезують АТФ [21]. Ці органели необхідні для численних клітинних функцій і тривалий час досліджувалися з фокусом на їхній здатності підтримувати енергетичний баланс організму. Додатково, мітохондрії виступають ключовими центрами клітинного метаболізму, беручи участь у перетворенні глюкози в ацетил-КоА, окисленні жирних кислот та регуляції окисно-відновного гомеостазу [22].

Ці функції забезпечуються унікальною структурою мітохондрій – системою подвійних мембран із внутрішніми складками (кристами), що збільшують площу поверхні та містять білкові комплекси електрон-транспортного ланцюга. Така подвійна мембранна організація та локалізація

компонентів електрон-транспортного ланцюга на внутрішній мембрані є критичними для формування протонного градієнта під час транспорту електронів для продукування АТФ [23]. Зовнішня мембрана функціонує як бар'єр дифузії малих молекул і сприяє формуванню концентраційних градієнтів, важливих для метаболічних процесів [22]. Білки зовнішньої мембрани також контролюють процеси злиття, поділу мітохондрій та мітофагію [24].

Останні десятиліття дослідження спрямовані на інтенсивне вивчення участі мітохондрій у клітинній сигналізації та регуляції відповіді на різні патофізіологічні стани. Це має особливе значення для метаболізму ліків, оскільки гепатоцити містять велику кількість мітохондрій, які у свою чергу містять критичні ферменти, включаючи цитохром P450 2E1 [25]. Хоча ферменти цитохром P450 2E1 забезпечують метаболізм ліків і детоксикацію ксенобіотиків, утворення реактивних метаболітів під час цих процесів відіграє ключову роль у виникненні патологічних станів, спричинених лікарськими препаратами. Показовим прикладом є гепатотоксичність спричинена ацетамінофеном (АРАР), де мітохондрії гепатоцитів відіграють центральну роль у патофізіології [26], що є основною причиною гострої печінкової недостатності у США та багатьох західних країнах [22].

Як уже зазначалося вище, під час метаболізму ацетамінофену утворюється реактивний метаболіт N-ацетил-*p*-бензохінонімін (NAPQI), що здатний утворювати аддукти на клітинних білках, а також виснажувати печінкові запаси глутатіону. Дослідження функцій мітохондрій виявили кореляцію між зв'язуванням NAPQI з мітохондріальними білками та токсичністю АРАР [27]. Дослідження демонструють, що надмірне застосування ацетамінофену порушує функціонування мітохондрій, зокрема пригнічує їх дихальну активність, посилює оксидативний стрес у мітохондріях та ініціює розвиток мітохондріальної проникності. Цей процес супроводжується втратою мітохондріального мембранного потенціалу та зменшення концентрації АТФ в печінці. Мітохондріальна проникність

характеризується раптовим підвищенням проникності внутрішньої мембрани мітохондрій для низькомолекулярних сполук масою до 1500 дальтон [28]. Стимулювання утворення активних форм кисню призводить до активації c-jun N-термінальної кінази (JNK). Подальша його міграція до мітохондрій та посилення мітохондріальної дисфункції призводять до руйнування мембранного потенціалу мітохондрій, формування перехідних пор мітохондріальної проникності та вивільнення клітинних нуклеаз, що в кінцевому результаті викликає фрагментацію ДНК та спричиняє загибель клітин [29].

Деякі дослідження виявили цікаву особливість мітохондрій під час патофізіологічних станів. За деяких умов, мітохондрії здатні змінювати свою морфологію як адаптаційний механізм [30]. Схожі зміни спостерігались і за раннього ураження ацетамінофеном. Було встановлено, що мітохондрії проходять двофазну трансформацію морфології у відповідь на дію АРАР: спочатку з'являється дископодібна форма, подібна до еритроцитів, яка супроводжується незначним зниженням мембранного потенціалу без порушень дихальної функції, після чого настає фрагментація мембрани, що характеризується значною втратою мембранного потенціалу та порушенням дихальної здатності. Рання трансформація обумовлена зниженням потенціалу мітохондріальних мембран, тоді як пізніша – включає модифікації канонічних білків поділу/злиття мітохондрій [29].

Мітохондрії виступають не лише джерелом вільних радикалів, що запускають сигнальні каскади, але й функціонують як інтеграційні центри, куди транслокуються цитозольні білки для посилення пошкоджень, викликаних початковим окиснювальним стресом. Це вірогідно, формує ефект порогового значення, внаслідок якого гепатоцити, що піддаються впливу різних концентрацій вільних радикалів, можуть демонструвати диференційовані реакції, тим самим модифікуючи функціональну відповідь печінки на ушкодження. Така модель дозволяє обмежити некротичні процеси в клітинах, які зазнають найвищого впливу ацетамінофену в центрилобулярній

зоні, зберігаючи клітини периферійних ділянок, що потенційно сприяє відновним та регенеративним процесам, забезпечуючи подальше заселення та нормалізацію функціональності печінки [31].

1.2. Сучасні уявлення про будову та функціонування ензимів циклу Кребса

Цикл Кребса, також відомий як цикл трикарбонових кислот (ЦТК) або цикл лимонної кислоти, є фундаментальним для всіх аеробних організмів. Цей цикл представляє собою послідовність хімічних реакцій, що відбуваються в матриці мітохондрій, які дозволяють аеробним організмам окислювати органічні сполуки та отримувати з них енергію. Він функціонує як фінальний етап багатьох метаболічних перетворень, зокрема ліпідів, вуглеводів та амінокислот і є добре вивченим та критично важливим біологічним механізмом енергозабезпечення, що поєднує практично всі інші індивідуальні метаболічні шляхи [32]. ЦТК також забезпечує синтез деяких макромолекул та підтримує окиснювально-відновний баланс в аеробних клітинах.

Енергія, необхідна для клітинної проліферації та виживання, отримується переважно із двох джерел: гліколізу та циклу Кребса. Обидва процеси залучені до клітинного дихання, причому реакції гліколізу протікають у цитоплазмі, тоді як реакції циклу трикарбонових кислот – в мітохондріях (у еукаріот, в прокаріот – у цитозолі). Ці процеси націлені на задоволення енергетичних потреб організму.

При гліколізі відбувається серія ферментативних реакцій перетворення глюкози, що супроводжується біосинтезом молекул АТФ. Гліколіз є критично важливим для функціонування мозку, енергетичні потреби якого залежать від доступності глюкози. Він вважається оптимальним способом енергозабезпечення в різних типах клітин.

ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ



Рис. 2.1. Реакції циклу трикарбонових кислот [33]

Під час ЦТК піруват, отриманий у процесі гліколізу, використовується для генерації 30-32 молекул АТФ з кожної молекули глюкози. Два атоми вуглецю окислюються до вуглекислого газу, а енергія цього окислення пов'язана з гуанозинтрифосфатом (ГТФ) або аденозинтрифосфатом (АТФ), гідроліз яких надалі забезпечує енергією інші метаболічні процеси, що їй потребують (рис. 2.1) [33].

1.2.1. Структурно-функціональні особливості NAD^+ -залежних ензимів

Серед ферментів циклу Кребса особливе місце займають NAD^+ -залежні дегідрогенази, які каталізують редокс-реакції з перенесенням гідридних іонів на нікотинамідаденіндинуклеотид (NAD^+), що є критичним для подальшого утворення відновних еквівалентів, необхідних для синтезу АТФ у дихальному ланцюзі мітохондрій.

NAD^+ виступає ключовим метаболітом, необхідним для перебігу численних окисно-відновних реакцій, що є ключовими для підтримання

клітинного гомеостазу та енергетичного метаболізму [34]. Структурно ця молекула є динуклеотидом, що складається з аденозинмонофосфату (АМФ), з'єднаного фосфатною групою з моонуклеотидом нікотинаміду (НМН), який включає фосфатну групу, рибозний компонент та нікотинамідне кільце [35]. Саме нікотинамідний компонент забезпечує основні електрохімічні властивості NAD^+ . Нікотинамідна група здатна приєднувати гідридний іон (H^+ , 2e^-), що призводить до відновлення NAD^+ до NADH . Відповідно, NADH може окислюватися до NAD^+ шляхом передачі гідридного іону акцепторним молекулам [34].

До NAD^+ -залежних ензимів циклу лимонної кислоти належать малат-, ізоцитрат- та α -кетоглутаратдегідрогенази. Вони представляють собою контрольні точки регуляції клітинного дихання.

Ізоцитратдегідрогеназа

Ізоцитратдегідрогеназа (ІДГ) – олігомерний білок з молекулярною масою близько 80-90 кДа. Активний центр містить залишки аргініну, тирозину та аспартату для зв'язування субстрату.

У циклі трикарбонових кислот ІДГ каталізує реакцію окислювального декарбоксілювання ізоцитрату з утворенням α -кетоглутарату, використовуючи NAD^+ або NADP^+ як кофермент (рис. 2.2) [36].

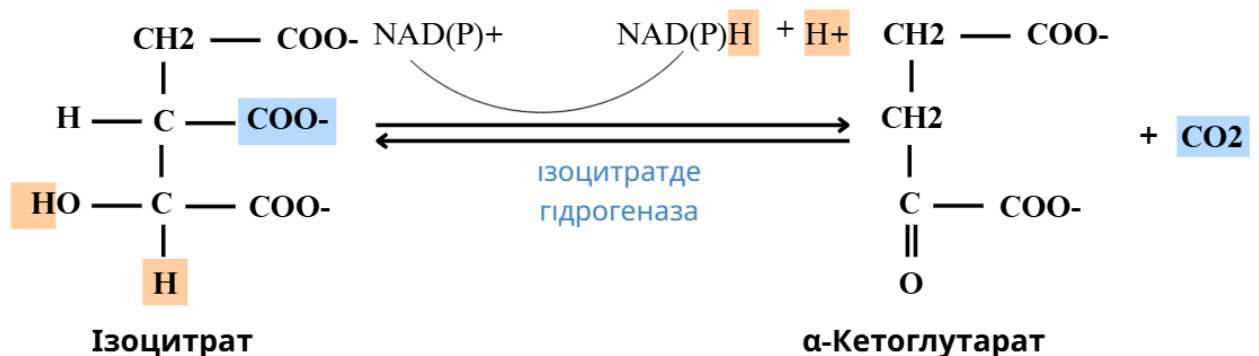


Рис. 2.2. Ізоцитратдегідрогеназна реакція ЦТК [37]

Ізоцитратдегідрогеназа функціонує у трьох ізоформах: ІДГ1 та ІДГ2 є NADP^+ -залежними ферментами, що знаходяться в цитозолі та мітохондріях відповідно; а також ІДГ3, що є NAD^+ -залежним ферментом локалізованим у мітохондріях [36].

α -кетоглутаратдегідрогеназа

Мітохондріальний α -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс є добре вивченим макромолекулярним ферментом.

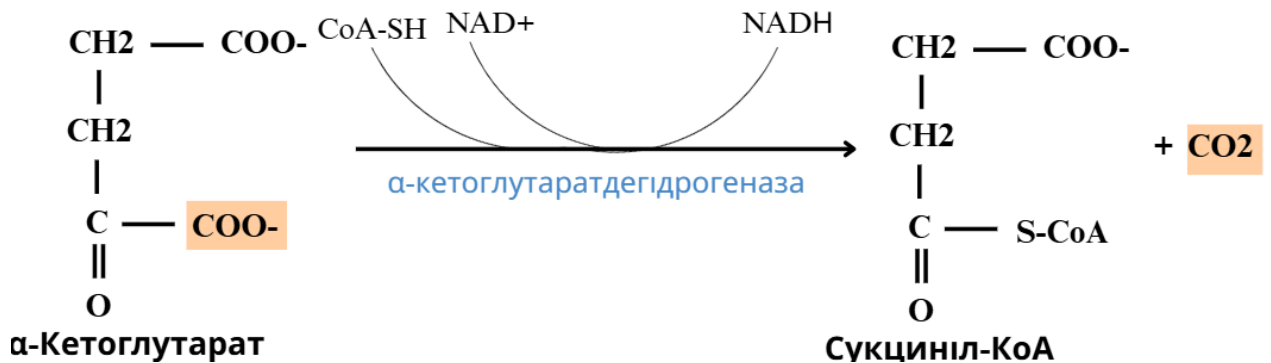


Рис. 2.3. α -кетоглутаратдегідрогеназна реакція циклу Кребса [37]

Цей ензиматичний комплекс функціонує як лімітуючий фактор у циклі трикарбонових кислот, каталізуючи реакцію перетворення α -кетоглутарату за участі коензиму А, що супроводжується відновленням NAD^+ до NADH з одночасним утворенням сукциніл-КоА та вивільненням CO_2 (рис. 2.3) [33].

Даний фермент має тримерну структуру і складається з трьох субодиниць, кожна з яких вносить свій внесок у свою загальну функцію: E1 – тіамінпірофосфат-залежна дегідрогеназа, E2 – дигідроліпоамідсукцинілтрансфераза та E3 – дигідроліпоаміддегідрогеназа, що є флавопротеїном [38].

Структурна цілісність і функція α -кетоглутаратдегідрогенази додатково підтримується такими кофакторами як тіамінпірофосфат, ліпоєва кислота та ФАД, які тісно пов'язані з ферментативним комплексом. Варто зазначити, що α -кетоглутарат, який є субстратом даного ензиму, також виступає центральним метаболітом у процесах біосинтезу ліпідних сполук, глутамінового метаболізму та численних інших біохімічних шляхів (посилання з курсової). Дисфункція α -кетоглутаратдегідрогенази асоціюється з різноманітними метаболічними порушеннями, патологічними станами та процесами старіння організму [39]. Цей ензим є не лише важливою ланкою ЦТК, але й чутливим біомаркером окисного стресу та мітохондріальної дисфункції [40].

Малатдегідрогеназа

Малатдегідрогеназа (МДГ) – гомодимер з молекулярною масою близько 70 кДа. Активний центр містить консервативні залишки аргініну та гістидину [41]. Він характеризується широким поширенням серед біологічних організмів та займає центральне місце в окисних метаболічних шляхах. Цей ензим відповідає за оборотну реакцію перетворення малату в оксалоацетат, використовуючи як кофактори окисні форми нікотинамідних коферментів NAD^+ або NADP^+ (рис. 2.4) [42].

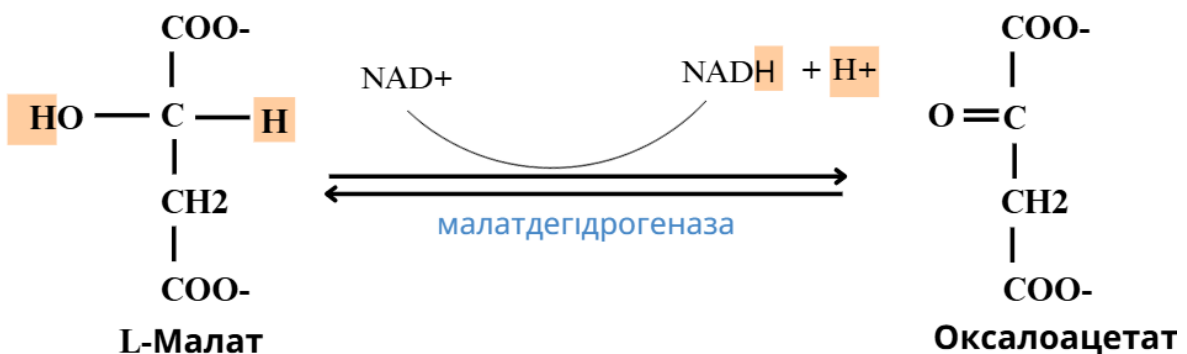


Рис. 2.4. Малатдегідрогеназна реакція ЦТК [37]

МДГ демонструє значну еволюційну консервативність серед усіх таксономічних груп живих організмів. У еукаріотичних клітинах виявлено різні ізоформи цього ферменту – цитозольну форму (цМДГ) та спеціалізовані ізоферменти, що локалізуються в різних органелах, включаючи мітохондрії (мМДГ), хлоропласти, пероксисоми та гліоксисоми. NADH , що утворюється під час реакцій, каталізованих цитозольною малатдегідрогеназою, бере участь у транспортуванні відновлювальних еквівалентів до мітохондрій через малат-аспартатний човниковий механізм у формі L-малату, що в подальшому сприяє синтезу АТФ. Мітохондріальна ізоформа МДГ відіграє подвійну роль: каталізує утворення оксалоацетату в ЦТК та забезпечує генерацію NADH , необхідного для окисного фосфорилування та продукції АТФ [43].

1.3. Гриби як потенційне джерело сполук із гепатопротекторними властивостями

Сьогодні актуальним напрямком сучасних досліджень залишається пошук природних біологічно активних речовин з гепатопротекторними властивостями. Особливу увагу науковців привертають гриби як перспективне джерело сполук з терапевтичним потенціалом. Застосування грибів з метою підтримання здоров'я та лікування різних патологічних станів має багатовікову історію в країнах Азії, тоді як в західних регіонах такий підхід почав розвиватися значно пізніше [44].

1.3.1. Загальна характеристика лікарських грибів та перспективи їх використання

Лікарські гриби характеризуються широким спектром фармакологічних ефектів, серед яких: антимікробна, протизапальна, імуномодулююча, протидіабетична, цитотоксична, антиоксидантна, гепатопротекторна, протипухлинна, антиалергічна, гіполіпідемічна та пребіотична дії [45]. Ці властивості зумовлені наявністю різноманітних біологічно активних метаболітів, що містяться як у міцелії, так і переважно у плодових тілах грибів. Біологічна активність цих сполук варіює залежно від їхньої хімічної структури, а якісний та кількісний склад відрізняється між видами грибів.

Фармакологічна активність лікарських грибів переважно демонструється в умовах *in vitro*, з подальшою або паралельною верифікацією на моделях *in vivo* з використанням лабораторних тварин. Ці експериментальні підходи дозволяють виявити терапевтичний потенціал грибів, їхніх екстрактів або окремих хімічних сполук [44].

Біологічно активні речовини, що містяться в грибах, є дуже різноманітними. Наприклад, гриби шиїтаке (*L. edodes*) використовуються як харчовий і лікарський продукт, починаючи з 600-1000 років до н.е. [45]. Вони синтезують різноманітні біоактивні компоненти – пептиди, стерини, полісахариди, білки та фенольні сполуки, що мають потенційно терапевтичне застосування [46]. Гриби містять різноманітні вуглеводи (клітковину, маннан,

целюлозу і хітин). Особливо цінними є глюкани з глікозидними зв'язками β (1,3), β (1,4) та β (1,6) [45].

Гриби також вирізняються високим вмістом вітамінів В2 і В3, які забезпечують ефективний метаболізм та енергетичний обмін поживних речовин, причому вітамін В2 додатково підтримує здоров'я шкіри. Вони також багаті на фолієву кислоту – вітамін, критично важливий для кровотворення та росту, який часто недостатньо представлений у щоденному раціоні людини. Серед мінералів у грибах у значних концентраціях наявні калій (регулює кров'яний тиск, нервово-м'язову діяльність), фосфор (зміцнює кісткову тканину, зуби та бере участь в енергетичному обміні) та мідь (підтримує імунну систему, нервові функції та клітинний синтез) [47]. Окрім зазначених вище біологічно активних сполук гриби містять також додаткові метаболіти, такі як фенольні сполуки, терпени та стероїди. Дані БАС здатні впливати на систему імунної відповіді. Це допомагає організму боротися з різними захворюваннями навіть раком. Часто досліджуваними видами грибів з потенційно терапевтичними властивостями та ядро вираженими фармакологічними характеристиками є: «*Coriolus versicolor, Pleurotus spp, Ganoderma lucidum, Antrodia cinnamomea, Lentinula edodes, Agaricus blazei* Murrill, *Grifola frondose, Hericium erinaceus, Agaricus bisporus* та ін.» [48]. Серед них особливо виділяється рід *Hericium*.

1.3.2. Рід *Hericium*: ботанічна характеристика, поширення, біологічно активні сполуки та гепатопротекторні властивості

Рід *Hericium* об'єднує сапротрофні деревні гриби, що відзначаються унікальною морфологією плодових тіл. На відміну від типових шапинкових грибів, представники роду *Hericium* формують плодові тіла із численними звисаючими шипоподібними або голчастими виростами, що надає їм характерного вигляду, який часто порівнюють з бородою, лєвовою гривовою або кораловими утвореннями [49].

Гриби роду *Hericiium* традиційно застосовуються як у кулінарії, так і в народній медицині Китаю [50]. Початково вони поширилися з Північної Америки і нині трапляються у природних умовах країн Східної Азії та Індії [51]. У європейських державах ці гриби можна зустріти рідко, натомість вони добре представлені в Японії та Північній Америці. Представники роду *Hericiium* відомі під різноманітними народними назвами: гриб лєвова грива, хутугу, ямасубітаке, помпон, біла борода та бородатий зуб [52].

Види роду *Hericiium* тривалий час досліджуються як джерело лікарських сполук. Виявлено, що низка біоактивних компонентів цих грибів демонструє імуностимулюючі властивості. *Hericiium* вважається перспективним джерелом інноваційних терапевтичних речовин, особливо тих, що впливають на нервову систему та мозок. Більшість нейротрофічних сполук у його складі здатні впливати на нервові клітини людини та проявляли активність щодо нейродегенеративних патологій, включаючи хворобу Альцгеймера та хворобу Паркінсона. Наукова література описує широкий спектр біологічно активних вторинних метаболітів у грибах даного роду: феноли, полікетиди, терпени, полісахариди, ліпополісахариди, глікопротеїни, пірони, алкалоїди, терпеноїди, стероїди та нерибосомні пептиди [51].

Особливе місце серед перспективних для дослідження грибів, є зокрема *Hericiium erinaceus* (відомий як "лєвова грива"), який протягом століть використовується у традиційній східній медицині. Наукові дослідження, виявили цінні біологічні властивості *H. erinaceus*, зокрема нейротрофічну та нейропротекторну активність. Результати клінічних досліджень підтвердили позитивний вплив екстрактів цього гриба на когнітивні функції людини. Зважаючи на наведені дані, дослідження біологічної активності екстрактів грибів роду *Hericiium*, зокрема їх впливу на метаболічні процеси в мітохондріях, є актуальним напрямком сучасної біохімії та біотехнології [53]. Гриби цього роду містять багатий комплекс біоактивних сполук, зокрема полісахариди, гериценони, еринацини, геріцерини, резорцини, стероїди, моно- і дитерпени, коралоцини, а також важливі нутрієнти [54]. У порівнянні з добре

вивченим *H. erinaceus*, біологічна активність та метаболітний профіль *Hericiium alpestre* залишаються маловивченими.

Попередні дослідження *in vitro*, проведені на кафедрі показали, що гриб *Hericiium alpestre* проявляє виражені антиоксидантні властивості. Базуючись на загальних характеристиках роду, а також на знаннях про можливості інших представників, ми припустили, що він також може виявляти гепатопротекторну дію.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на білих лабораторних щурах, середня маса яких становила від 200 до 250 г. Всі маніпуляції/процедури, які застосовувалися щодо лабораторних тварин, проводили відповідно до вимог біоетики згідно із «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Київ, 2001), та положенням Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів чи в інших цілях (Страсбург, 1986).

Відповідно до норм утримання, щури були згруповані за статтю і кількістю та поміщені в пластикові клітки з вільним доступом до їжі та води. Протягом експерименту за тваринами велося щоденне спостереження [55].

Для експерименту тварини були поділені на 5 груп: I – тварини, які є інтактними (К); II – група тварин, яким вводили екстракт *Hericium alpestre* протягом 10 днів у концентрації 200 мг/мл (ЕГА); III – група тварин, що протягом двох днів отримували ацетамінофен перорально у вигляді 2%-го розчину крохмального гелю, у добовій дозі 1250 мг/кг (ТУ); IV – група тварин, яким вводили етанольний екстракт *Hericium alpestre* протягом 10 днів, у дозі 200 мг/мл, після чого на 11-12 день отримували ацетамінофен для моделювання токсичного ураження (ЕГА+ТУ); V – група тварин, 2 дні вводили токсичну дозу АРАР, а після протягом 7 днів вони отримували етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre* у дозі 500 мг/мл (ТУ+ЕГА).

Зважування тварин проводилось двічі – перед початком експерименту і безпосередньо перед розтином. Розтин тварин проводили під легким ефірним наркозом.

Приготування етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

Етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre* готували методом рідинної екстракції. «До кожного порошкоподібного зразка гриба (5 г) додавали 70% етанол в об'ємі 50 мл, змішували, після чого розчин струшували при 150 об/хв за кімнатної температури протягом 24 годин; потім отриманий розчин

центрифугували при 12000 об/хв протягом 15 хв. Після центрифугування, супернатант фільтрували за допомогою фільтрувального паперу Ватман, фільтрат збирали. Зібраний залишок повторно екстрагували за тих же умов. Отриманий екстракт концентрували під вакуумом при температурі 40° С на роторному випарнику Labfreez RE-2000E. Отриманий зразок зберігали в темному місці при температурі 4° С» [56].

Для подальшого введення тваринам готували екстракти таких концентрацій: 200 та 500 мг/кг маси тіла.

Виділення мітохондріальної фракції

Мітохондрії виділяли із печінки, за допомогою методу диференційного центрифугування [57]. Проведення всіх етапів потребує строгого дотримання оптимальних температур (0 - 4°С) із використанням інструментів, що були попередньо охолодженими. Першим етапом виділення мітохондрій із клітин є гомогенізація тканин. Печінку (4 г) подрібнювали, добавляли частину буферу А (загальний об'єм 20 мл), та гомогенізували. Буфер А (середовище для гомогенізації) містить наступні компоненти: 250 мМ сахарозу, 30 мМ Трис-НСІ (рН 7,4), 1 мМ ЕДТА (готується напередодні експерименту і зберігається в холодильнику до використання). Після цього гомогенат відфільтровували за допомогою марлі у чисті пробірки для подальшого центрифугування. При першому центрифугуванні при 10000 g протягом 10 хв осідають ядра та частинки зруйнованих клітин. Супернатант, який утворився, при цьому відбирали і центрифугували вдруге при 12000 g на протязі 15 хв. В даному випадку осідати будуть мітохондрії. До осаду додавали буфер Б об'ємом 5 мл. Склад буферу Б ідентичний вмісту реактивів буферу А, тільки не містить ЕДТА. Ще раз центрифугували 10 хв при 12000 g. Осад промивали буфером повторно [57].

Вміст білка у пробі визначають за методом Лоурі.

Визначання активності NAD^+ -залежних ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК)

Активність NAD^+ -залежних ферментів ЦТК визначали за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 340 нм у загальному об'ємі реакційної суміші 3 мл. Використовувані нами методи ґрунтуються на здатності NAD^+ відновлюватись до $NADH$. Активність ензимів пропорційно дорівнює кількості відновленого NAD^+ і розраховують з урахуванням показника молярної екстинції – $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$.

Для визначення активності ізоцитратдегідрогенази (ІДГ) було приготовлене інкубаційне середовище для проведення ферментативної реакції. Воно містило наступні компоненти (мМ): Трис-НСІ (рН 8) – 10, $MgCl_2$ – 5, NAD – 0,2, ізоцитрат натрію – 2. Для проведення ферментативної реакції в кювету шириною 1 см першочергово вносили інкубаційне середовище загальним об'ємом 2,9 мл, після чого додавали 0,1 мл мітохондріального препарату тим самим починаючи реакцію, показники фіксувалися кожні 30 с протягом 3 хв. Для розрахунку активності NAD -ізоцитратдегідрогенази використовували зміну контрольної щільності (ΔE), активність (в нмолях $NADH$ /хв на 1 мл білка) вираховують з урахуванням показника молярної екстинції – $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$.

Для визначення активності α -кетоглутаратдегідрогенази (α -КГДГ) склад інкубаційного середовища містив такі компоненти (мМ): К-фосфатний буфер (рН 7,4) – 63, $MgCl_2$ – 2, ЕДТА – 0,63, тіамініпрофосфат – 0,2, коензим-А – 0,3, α -кетоглутарат – 1, NAD – 1, дитіотріетол – 1. Умови проведення ферментативної реакції такі ж як і при визначенні активності ізоцитратдегідрогенази. Реакцію починаюли введенням 0,1 мл лізату мітохондрій в інкубаційне середовище, зміну оптичної густини фіксували кожні 30 с протягом 3 хв. Активність α -кетоглутаратдегідрогенази (в мкмолях $NADH$ /хв в 1 мг білка) розраховують

Малатдегідрогеназну (МДГ) активність визначали в інкубаційному середовищі, до складу якого входили (мМ): Трис-НСІ (рН 7,4) – 50, NAD – 0,2,

малат – 5, $MgCl_2$ – 5. Для проведення ензиматичної реакції в кювету спектрофотометру шириною 1 см наливали 2,9 мл середовища для інкубації; реакцію починали додаванням 0,1 мл мітохондріального препарату. Збільшення оптичної густини зчитували через кожні 30 с протягом 2 хв [59]. Активність визначали з урахуванням молярної екстинції.

Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Для опрацювання результатів застосовували методи варіаційної статистики з розрахунком середнього арифметичного значення (M) та стандартної похибки середнього ($\pm m$). Оцінку статистичної значущості відмінностей між групами здійснювали за t -критерієм Стюдента з визначенням показника достовірності (P). Отримані кількісні дані та їх статистична оцінка представлені у вигляді графічних зображень.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Токсичне ураження ацетамінофеном є провідною причиною медикаментозних уражень печінки, що зумовлює необхідність пошуку ефективних гепатопротекторних засобів [1]. Найбільш поширеними препаратами синтетичного походження, що володіють гепатопротекторною дією, є урсодезоксихолева кислота, силамірин та N-ацетилцистеїн (безпосередньо використовують при ураженні ацетамінофеном, як попередник глутатіону). Незважаючи на їх відновно-захисні властивості, часте застосування може призвести до побічних ефектів, таких як розвиток жовтяниці [60], появою різних симптомів у кишківнику (метеоризми, дискомфорт в животі, діарея) [61]. Натомість численні дослідження показують, що гепатопротекторні засоби природного походження виявляють менше побічних дій. Тому залишається актуальним питання пошуку гепатопротекторних засобів природнього походження [62]. Природні біоактивні компоненти були визнані цінними альтернативами для попередження, зменшення гепатотоксичних ефектів та їх хронічних ускладнень, завдяки їх антиоксидантній здатності [63]. Серед лікарських грибів представники роду *Hericium* демонструють особливий потенціал для вивчення завдяки наявності різноманітних біоактивних метаболітів у їх складі (фенольні сполуки, терпенові похідні, полісахариди, глікопротеїди, алкалоїди, стероїди тощо) [5]. Проте *Hericium alpestre* залишається не вивченим. Тому в рамках досліджень, які проводяться в лабораторіях кафедри біохімії та біотехнології, нами проаналізований вплив екстракту на активність ензимів циклу Кребса.

Попередніми дослідженнями встановлено, що токсичність ацетамінофену призводить до розвитку окисного стресу та порушень мітохондріальної функції [54]. Результати наших досліджень показали, що за умов введення токсичних доз ацетамінофену спостерігається зниження ізоцитратдегідрогеназної активності приблизно на 45% (рис. 3.1) та α -кетоглутаратдегідрогенази приблизно вдвічі (рис. 3.2) порівняно з контролем.

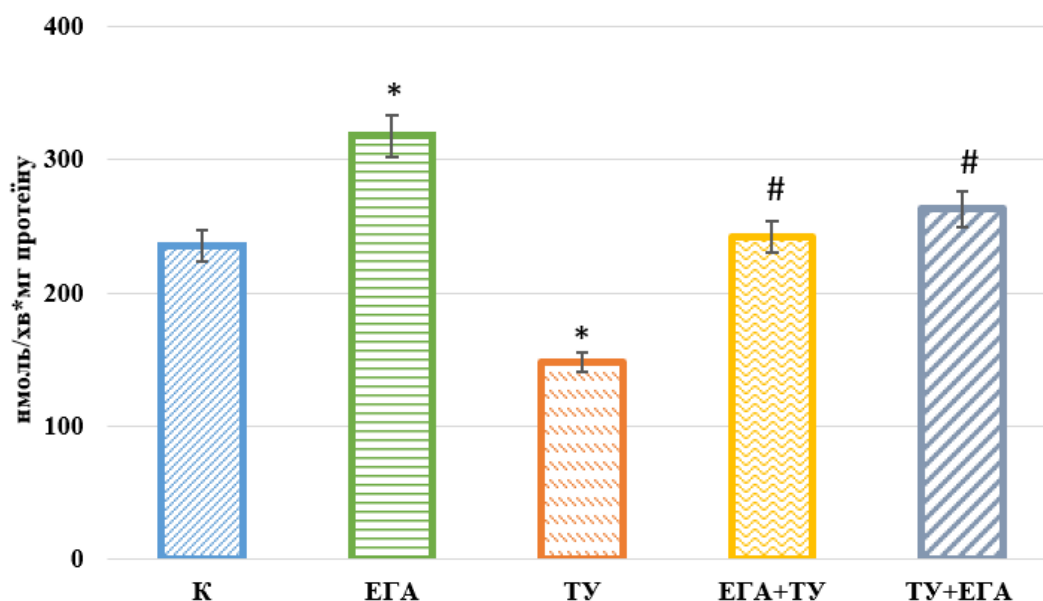


Рис. 3.1. Ізоцитратдегідрогеназна активність у мітохондріях печінки щурів за умов введення етанольного екстракту *Hericium alpesntre* та токсичного ураження ацетамінофеном

Примітка (тут і надалі):

K – контроль; *ЕГА* – отримували екстракт, 10 діб у дозі 200 мг/кг; *ТУ* – тварини з токсичне ураження ацетамінофеном; *ЕГА+ТУ* – тварини, яким вводили екстракт у дозі 200 мг/кг перед токсичним ураженням; *ТУ+ЕГА* – тварини, яким вводили екстракт у дозі 500 мг/кг після моделювання токсичного ураження.

*- статистично достовірні різниця порівняно з контролем, $p < 0,05$

#- статистично достовірні різниця порівняно з групою *ТУ*, $p < 0,05$

Ймовірно, зниження досліджуваних ензиматичних активностей за умов токсичного ураження ацетамінофеном може бути зумовлено кількома причинами. Зокрема, в літературі показано, що при метаболізмі ацетамінофену утворюється реактивний метаболіт N-ацетил-*p*-бензохінонімін (NAPQI) [9], що здатний посилювати утворення активних форм кисню (АФК) та викликати окислювальний стрес [19]. АФК у свою чергу здатні окислювати критично важливі тіолові та сульфгідрильні групи ферментів циклу Кребса, що призводить до зниження їх каталітичної активності. Іншою причиною такого ефекту може бути пряма модифікація ферментів токсичними метаболітами ацетамінофену. NAPQI здатний зв'язуватись із функціональними групами

амінокислотних залишків та утворювати аддукти з білковими компонентами ферментів, що призводить до їх необоротних структурних змін [20]. Також в літературі описано, що наслідком токсичного ураження ацетамінофеном є мітохондріальна дисфункція, що супроводжується порушенням електронного транспорту і деполяризацією мітохондріальної мембрани. Це призводить до змін внутрішнього мітохондріального середовища, яке є необхідним для нормального функціонування ензимів [29]. Деякі автори також вказують на те, що зниження активності ензимів може бути пов'язано із виснаженням пулу молекул NAD^+ , коферменту досліджуваних ензимів [65].

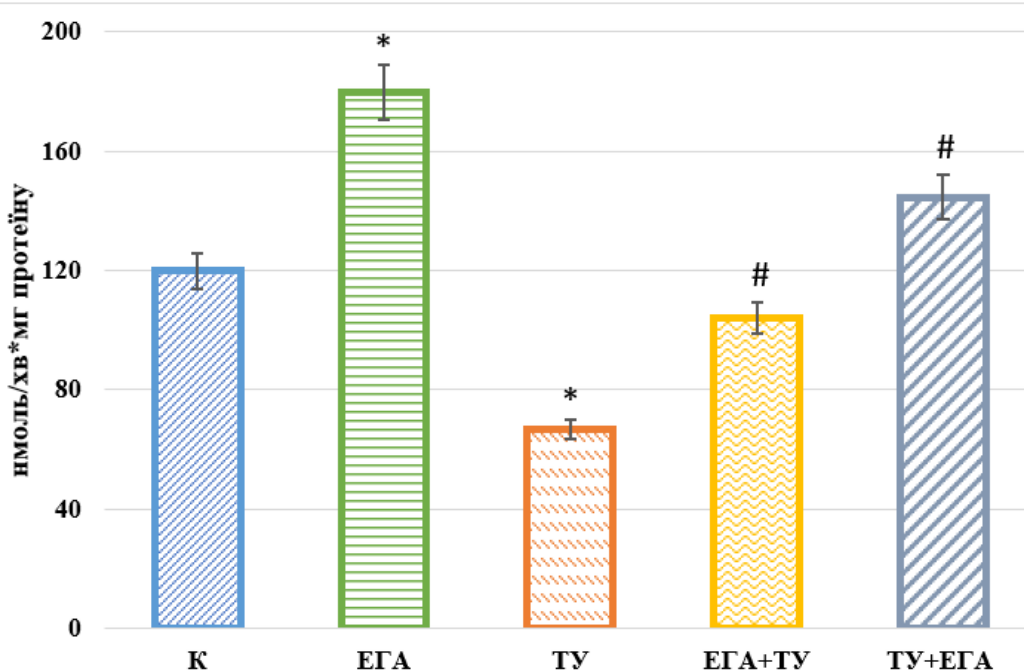


Рис. 3.2. α -кетоглутаратдегідрогеназна активність за умов ацетамінофен-індукованого токсичного ураження та введення етанольного екстракту *Hericium alpestre*

Натомість, для активності малатдегідрогенази характерна інша тенденція (рис. 3.3). У тварин з токсичним ураженням активність МДГ не відрізняється від показників контролю. Ймовірно, встановлений нами факт може розглядатися як компенсаторна реакція, спрямована на підтримання роботи циклу Кребса та енергетичного забезпечення клітин печінки за умов їх токсичного пошкодження. Відомо, що пул малату у мітохондріях може поповнюватися за рахунок анаплеротичних реакцій, зокрема каталізованих

цитозольною формою малатдегідрогенази або в аспартатамінотрасферазній реакції з наступним утворенням оксалоацетату та відновленням за дії цитозольної форми малатдегідрогенази [66].

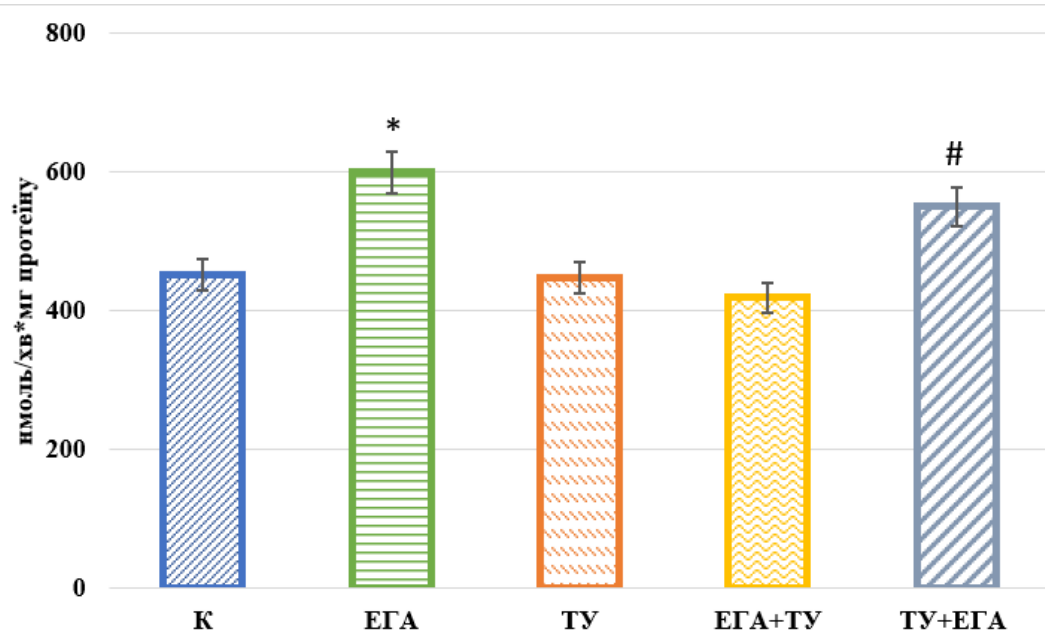


Рис. 3.3. Малатдегідрогеназна активність за умов токсичного ураження індукованого ацетамінофеном та введенням спиртового екстракту *Hericum alpestre*

Слід відмітити, що введення етанольного екстракту *Hericum alpestre* здоровим тваринам протягом 10 днів призводить до активації активності досліджуваних ензимів (рис. 3.1-3.3), що, ймовірно, пов'язане з тим, що вторинні метаболіти гриба (еранацини та геріценони) можуть проявляти нейрометаболічну активність, тим самим збільшувати внутрішньоклітинний попит на енергію або модулювати сигнальні шляхи (наприклад АМПК/PGC-1 α), які стимулюють метаболічну активність клітин, зокрема цикл Кребса [67]. З іншого боку, активація досліджуваних ензимів може бути зумовлена впливом мікроелементів, які містяться у складі гриба (наприклад, цинк, магній, селен), вітаміни групи В та інші сполуки, що можуть виступати їх природними коактиваторами [68].

Слід зазначити, що у тварин, яким вводили спиртовий екстракт досліджуваного гриба *Hericium alpestre* після моделювання токсичного ураження, спостерігається відновлення активності досліджуваних ензимів циклу трикарбонних кислот до показників контролю (рис. 3.1 – 3.3).

Отримані результати щодо статистично значущого зростання активності NAD^+ -залежних ферментів циклу Кребса за умов ведення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* можуть бути пояснені активацією мітохондріального біогенезу через PGC-1 α -опосередкований механізм [69]. PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) є головним регулятором мітохондріального біогенезу та відіграє ключову роль у підтриманні енергетичного гомеостазу клітини [67]. Біологічно активні сполуки гриба, зокрема геріценони, еринацини та полісахариди, здійснюють стимулюючий вплив на цей транскрипційний коактиватор, що призводить до каскаду молекулярних подій, спрямованих на посилення мітохондріальної функції [68].

Активація PGC-1 α ініціює транскрипційну програму, яка включає підвищену експресію генів, що кодують ключові ферменти циклу Кребса, включаючи ізоцитратдегідрогеназу, α -кетоглутаратдегідрогеназу та малатдегідрогеназу [67, 69]. Паралельно відбувається стимуляція біогенезу мітохондрій, що проявляється збільшенням їх кількості та посиленням їх функціональної активності [67]. Цей процес супроводжується підвищенням синтезу мітохондріальних білків та оптимізацією дихального ланцюга, що створює сприятливі умови для ефективного функціонування НАД-залежних дегідрогеназ [69].

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що токсичне ураження печінки ацетамінофеном у дозі 1250 мг/кг протягом двох днів призводить до статистично значущого зниження активності ізоцитратдегідрогенази та α -кетоглутаратдегідрогенази при збереженні малатдегідрогеназної активності на рівні показників контролю.

2. Показано, що профілактичне введення етанольного екстракту *Hericium alpestre* у дозі 200 мг/кг протягом 10 днів перед токсичним ураженням супроводжується відновленням ензиматичних активностей α -кетоглутаратдегідрогенази та ізоцитратдегідрогенази до контрольних значень.

3. Встановлено, що застосування спиртового екстракту гриба *Hericium alpestre* у дозі 500 мг/кг протягом 7 днів після токсичного ураження індукує виражене підвищення активностей усіх NAD^+ -залежних ензимів циклу Кребса, що свідчить про позитивний ефект біологічно-активних сполук екстракту на стан системи енергозабезпечення клітин печінки за умов ураження ацетамінофеном.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Franco F., Malonn M. C. Toxicodynamic aspects and new tools for assessing acetaminophen toxicity: a review. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. 2021. Vol. 09. P. 28-38.
2. Zade S., Upadhyay T. K., Rab S. O., Sharangi A. B., Lakhanpal S., Alabdallah N. M., Saeed M. Mushroom-derived bioactive compounds pharmacological properties and cancer targeting: a holistic assessment. *Discover oncology*. 2025. Vol. 16, № 654. Режим доступу: <https://doi.org/10.1007/s12672-025-02371-z>
3. Soares A. A., Babeto-de-Sa-Nakanishi A., Bracht A., Gomes-de-Costa S. M., Koehnlein E. A., Marques-de-Souza C. G., Peralta R. M. Hepatoprotective Effects of Mushrooms. *Molecules*. 2013. Vol 18. P. 7609-7630.
4. Zhang J-J., Li Y., Zhou T., Xu D-P., Zhang P., Li S., Li H-B. Bioactivities and Health Benefits of Mushrooms Mainly from China. *Molecules*. 2016. Vol. 21 (7). P. 938.
5. Gonkhom D., Luangharm T., Raghoonundon B., Hyde K. D., Stadler M., Thongklang N. *Herichium*: A review of the cultivation, health-enhancing applications, economic importance, industrial, and pharmaceutical applications. *Fungal Biotech*. 2021. Vol. 1 (2). P. 117-129.
6. 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.
7. Athersuch T. J., Antonie D., Boobis A. R., Coen M., Daly A. K., Possamai L., Nicholson J. K., Wilson I. D. Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective. *Toxicol Res (Camb)*. 2018. Vol. 7(3). P. 347-357.
8. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminofen. *PubChem*. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>.

9. Sharma C. V., Mehta V. Paracetamol: mechanisms and updates. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*. 2014. Vol. 14. P. 153-158.
10. McGill M. R., Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm Res*. 2013. Vol. 30 (9). P. 2174-2187.
11. Yamamoto A., Liu M-Y., Kurogi K., Sakakibara Y., Saeki Y., Suiko M., Liu M-C. Sulphftion of acetaminophen by the human cytosolic sulfotransferases: a systematic analysis. *J Biochem*. 2015. Vol. 158 (6). P. 497-504.
12. Yoon E., Babar A., Choundhary M., Kutner M., Pysopoulos N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicitz: a Comprehensive Update. *J Clin Transl Hepatol*. 2016. Vol. 4 (2). P. 131-142.
13. 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. *Pharmacogenet Genomics*. 2015. Vol. 25 (8). P. 416-426.
14. Board G. P., Menon D. Clutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2013. Vol. 1830, №5. P 3267-3288.
15. Xie Y., McGill M. R., Cook S. F., Sharpe M. R., Winefield R. D., Wilkins D. G., Rollins D. E., Jaeschke H. Time course of acetaminophen-protein adducts and acetaminophen metabolites in circulation of overdose patients and in HepaRG cells. *Xenobiotica*. 2015. Vol. 45 (10). P. 921-929.
16. McGill M. R., Lebofsky M., Norris H-R. K., Slawson M. H., Bajt M. L., Xie Y., Williams C. D., Wilkins D. G., Rollins D. E., Jaeschke H. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: Dose-response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013. Vol. 269, № 3. P. 240-249.

17. Du K., Ramachandran A., Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology*. 2016. Vol. 10. P. 148-156.
18. Jaeschke H., Ramachandran A. Oxidant Stress and Lipid Peroxidation in Acetaminophen Hepatotoxicity. *React Oxyg Species (Apex)*. 2018. Vol. 5 (15). P. 145-158.
19. Cederbaum A. I. Role of Cytochrome P450 and Oxidative Stress in Alcohol-Induced Liver Injury. *Reactive Oxygen Species*. 2017. Vol. 4, № 11. P. 303-319.
20. Jaeschke H., McGill MR., Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria and cell death mechanism drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*. 2017. Vol. 44 (1). P. 88-106.
21. Roger A. J., Munoz-Gomez S. A., Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*. 2017. Vol. 27, № 21. P. 1177-1192.
22. Ramachandran A., Jaeschke H. Mitochondria in Acetaminophen-Induced Liver Injury and Recovery: A Concise Review. *Livers*. 2023. Vol. 3 (2). P. 219-231.
23. Glancy B., Kim Y., Katti P., Willingham T. B. The Functional Impact of Mitochondrial Structure Across Subcellular Scales. *Front. Physiol*. 2020. Vol. 11. Режим доступа: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.541040>
24. Xian H., Liou Y-C. Functions of outer mitochondrial proteins: mediating the crosstalk between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Cell Death Differ*. 2021. Vol. 28. P. 827-842.
25. Massart J., Begriche K., Hartman J. H., Fromenty B. Role of Mitochondrial Cytochrome P450 2E1 in Healthy and Diseased Liver. *Cells*. 2022. Vol. 11 (2). P. 288.
26. Ramachandran A., Jaeschke H. Chapter Seven – Acetaminophen hepatotoxicity: A mitochondrial perspective. *Advances in Pharmacology*. 2019. Vol. 85. P. 195-219.

27. Ramachandran A., Jaeschke H. A mitochondrial journey through acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2020. Vol. 140. Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111282>
28. Hu J., Ranschesch V .K., McGill M. R., Jaeschke H., Lemasters J. J. Low Dose Acetaminophen Induces Reversible Mitochondrial Dysfunction Associated with Transient c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Mouse Liver. *Toxicological Sciences.* 2016. Vol. 15, № 1. P. 204-215.
29. Umbaugh D. S., Nguyen NT., Jaeschke H., Ramachandran A. Mitochondrial Membrane Potential Drives Early Change in Mitochondrial Morphology After Acetaminophen Exposure. *Toxicol Sci.* 2021. Vol. 180 (1). P. 186-195.
30. Liu X., Hajnoczky G. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death & Differentiation.* 2011. Vol. 18. P. 1561-1572.
31. Ramachandran A., Jaeschke H. Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene Expr.* 2018. Vol. 18 (1). P. 19-30.
32. Akram M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochemistry and Biophysics.* 2014. Vol. 68. P. 475-478.
33. Gasmi A., Peana M., Arshad M., Butnariu M., Menzel A., Bjorklund G. Krebs cycle: activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis. *Archives of Toxicology.* 2021. Vol. 95 (4). P. 1161-1178.
34. Navas L. E., Carnero A. Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) Metabolism as a Relevant Target in Cancer. *Cells.* 2022. Vol. 11 (17). P. 2627.
35. Navas L. E., Carnero A. NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2021. Vol. 6, № 2. Режим доступа: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00354-w>
36. Sun P., Liu T., Ding J. Structure and allosteric regulation of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *Cell Discovery.* 2020. Vol. 6, № 94. Режим доступа: <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00220-7>

37. Citric Acid cycle or Tricarboxylic Acid or Krebs Cycle Overview and brief history. 2014. Режим доступа: <https://www.slideserve.com/tamah/citric-acid-cycle-or-tricarboxylic-acid-cycle-or-krebs-cycle-overview-and-brief-history>
38. Zhong Y., Gao Y., Zhong D., Ma X., Chen H., Xu Y., Yang W., Yu X. Structural basis for the activity and regulation of human α -ketoglutarate dehydrogenase revealed by Cryo-EM. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022. Vol. 602. P. 120-126.
39. Nemeria N. S., Gerfen G., Yang L., Zhang X., Jordan F. Evidence for functional and regulatory cross-talk between the tricarboxylic acid cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and 2-oxoadipate dehydrogenase on the L-lysine, L-hydroxylysine and L-tryptophan degradation pathways from studies *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2018. Vol. 1859. № 9. P. 932-939.
40. Bezerra G. A., Foster W. R., Bailey H. J., Hicks K. G., Sauer S. W., Dimitrov B., McCorvie T. J., Okun J. G., Rutter J., Kölker S., Yue W. W. Crystal structure and interaction studies of human DHTKD1 provide insight into a mitochondrial megacomplex in lysine catabolism. *IUCrJ*. 2020. Vol. 7, № 4. P. 693-706.
41. Lorenzo Ld., Stack T MM., Fox KM., Walstrom KM. Catalytic mechanism and kinetics of malate dehydrogenase. *Essays Biochem*. 2024. Vol. 68 (2). P. 73-82.
42. Takahaschi-Iniguez T., Aberto-Rodriguez N., Vilchis-Gonzalez A. L., Flores ME. Function, kinetic properties, crystallization, and regulation of microbial malate dehydrogenase. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2016. Vol. 17 (4). P. 247-261.
43. Venturella G., Ferrari V., Cirilincione F., Gargano M. L. Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22 (2). P. 634.
44. Elkhateed W. A. What Medical Mushroom Can Do? *Chemistry Research Journal*. 2020. Vol. 5 (1). P. 106-118.

45. Singh A., Saini R. K., Kumar A., Chawla P., Kaushik R. Mushrooms as Nutritional Powerhouses: A Review of Their Bioactive Compounds, Health Benefits, and Value-Added Products. *Foods*. 2025. Vol. 14 (5). P. 741.
46. Landi Nicola., Clemente A., Pedone PV., Raducci S., Maro A. D. An Update Review of Bioactive Peptides from Mushrooms in a Well-Defined Molecular Weight Range. *Toxins*. 2022. Vol. 14, № 2. P. 84.
47. Chosal A. Mushroom cultivation: an alternate livelihood option. *Technical Bulletin*. 2023. P. 6-31.
48. Zade S., Upadhyay T. K., Rab S. O., Sharangi A. B., Lakhnarpal S., Alabdallah N. M., Saeed M. Mushroom – derived bioactive compounds pharmacological properties and cancer targeting: a holistic assessment. *Discover Oncology*. 2025. Vol. 16, № 654. РЕЖИМ ДОСТУПУ: <https://doi.org/10.1007/s12672-025-02371-z>
49. Sokovic M., Glamoclija J., Ciric A., Petrovic J., Stojkovic D. Chapter 5 – Mushrooms as Sources of Therapeutic Foods. *Therapeutic Foods*. 2018. P. 141-178. РЕЖИМ ДОСТУПУ: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811517-6.00005-2>
50. Shao S., Wang D., Zheng W., Li X. A unique polysaccharide from *Hericium erinaceus* mycelium ameliorates acetic acid-induced ulcerative colitis rats by modulating the composition of the gut microbiota, short chain fatty acid levels and GPR41/43 receptors. *Internationale immunopharmacology*. 2019. Vol. 71. P. 411-422.
51. Gonkhom D., Luangharm T., Raghoonundon B., Hyde K. D., Stadler M., Thongklang N. *Hericium*: A review of the cultivation, health-enhancing applications, economic importance, industrial, and pharmaceutical applications. *Fungal Biotech*. 2021. Vol. 1 (2). P. 117-129.
52. Sangtitanu T., Sangtanoo P., Saisavoey T., Srimongkol P., Reamtong O., Karnchanatat A. Peptides obtained from edible mushrooms: *Hericium erinaceus* offers the ability to scavenge free radical and induce apoptosis in lung cancer cells in humans. *Food Function*. 2020. Vol. 11 (6). P. 4927-4939.

53. Kostanda E., Musa S., Pereman I. Unveiling the Chemical Composition and Biofunctionality of *Hericium* spp. Fungi: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci.* 2024. Vol. 25 (11). P. 5949.

54. Kopylchuk H. P., Nykolaichuk I. M., Lylyk I. S. Indexes of alimentary protein deficiency. *Ukr. Biochem. J.* 2020. Vol. 92, № 1. P. 113-119.

55. Kopylchuk H. P., Voloshchuk O. M., Pasailiuk M. V. Comparison of total amino 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. P. 112-125.

56. Liao P.-C., Bergamini C., Fato R., Pon L. A., Pallotti F. Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Methoda Cell Biol.* 2020. Vol. 155. P. 3-31.

57. Shen C.-H. Chapter 8 – Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Molecular Biology.* 2019. P. 187-214. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00008-0>

58. Wagner M., Bertero E., Nickel A., Kohlhaas M., Gibson G. E., Heggermont W., Heymans S., Maack C. Selective NADH communication from α -ketoglutarate dehydrogenase to mitochondrial transhydrogenase prevents reactive oxygen species formation under reducing in the heart. *Basic Res Cardiol.* 2020. Vol. 115, № 5. P. 53.

59. Wongkittichote P., Cunningham G., L. Summar M., Pumbo E., Forny P., R. Baumgartner M., A. Chapman K. Tricarboxylic acid cycle enzyme activities in a mouse model oh methylmalonic aciduria. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2019. Vol. 124, № 4. P. 444-451.

60. Drugbanc. Ursodeoxycholic acid. *Drugbanc.* 2007. Режим доступа: [Ursodeoxycholic acid: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online.](https://www.drugbankonline.com/ursodeoxycholic-acid)

61. Aladejand E. B., Adeladejana A. E. Hepatoprotective activities of polyherbal formulations: A systematic review. *Journal of Medicinal plants for economic development.* 2023. Vol. 7, № 1. Режим доступа: <https://doi.org/10.4102/jomped.v7i1.206>

62. Ilyas U., Katare D. P., Aeri V., Naseef P. P. A Review on Hepatoprotective and Immunomodulatory Herbal Plants. *Pharmacogn Rev.* 2016. Vol. 10 (19). P. 66-70.
63. Pandey B., Baral R., Kaundinnyayana A., Panta S. Promising hepatoprotective agents from the natural sources: a study of scientific evidence. *Egyptian Liver Journal.* 2023. Vol. 13, № 14. Режим доступа: <https://doi.org/10.1186/s43066-023-00248-w>
64. Sluzaly P., Pasko P., Galanty A. Natural Products as Hepatoprotective Agents – A Comprehensive Review of Clinical Trials. *Plants.* 2024. Vol. 13 (14). P. 1985.
65. Wang Y., Umanah G. K., Park H., Nambiar K., Eacker S. M., Kim B., Bao L., Harraz M. M., Chang C., Wang J. E., Kam T-I., Jeong J. S., Xie Z., Neifert S., Qian J., Andrabi S. A., Blackshaw S., Zhu H., Song H., Ming G-L., Dawson V. L., Dawson T. M. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science.* 2016. Vol. 354, № 6308. Режим доступа: <https://doi.org/10.1126/science.aad6872>
66. Lee S-M., Dho S. H., Ju S-K., Maeng J-S., Kim J-Y., Kwon K-S. Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts. *Biogerontology.* 2013. Vol. 13. P. 525-536.
67. Amara I., Scuto M., Zappala A., Ontario M. L., Pertalia A., Abid-Essefi S., Maiolino L., Signorile A., Salinaro A. T., Calabrese V. *Heridium Erinaceus* Prevents DEHP-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in PC12 Cells. *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 21 (6). P. 2138.
68. Wang M., Konishi T., Gao Y., Xu D., Gao Q. Anti-Gastric Ulcer Activity of Polysaccharide Fraction Isolated from Mycelium Culture of Lion`s Mane Medicinal Mushrooms, *Heridium erinaceus* (Higher Basidiomycetes). *Int J Med Mushrooms.* 2015. Vol. 17 (11). P. 1055-60.
69. Scarpulla R. C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.* 2011. Vol. 1813 (7). P. 1269-78.

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Під час роботи в лабораторії необхідно дотримуватись 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 знаходяться під витяжною шафою;
- ✓ усі дослідження з отруйними речовинами та речовинами із їдким запахом проводити тільки під витяжною шафою;
- ✓ наливати або насипати реактиви слід тільки над столом;
- ✓ не слід залишати відкритими банки з реактивами;
- ✓ пролиті та 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 поблищу 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 лабораторними обладнаннями

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 піпеткою 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 багаторазовою прополоскати наконечники;

- ✓ після закінчення роботи слід помістити піпетку в штативі.