

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**ЛАБОРАТОРНІ МАРКЕРИ СТАНУ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ З
ТОКСИЧНИМ УРАЖЕННЯМ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ ЕТАНОЛЬНОГО
ЕКСТРАКТУ ГРИБА *HERICIUM ALPESTRE***

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:
студентка 6 курсу, група 200М
Шнайдер Інна Сергіївна
Керівник:
кандидат біологічних наук,
доцент **Волощук О.М.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2025 р.
Зав. кафедрою _____ доц. Волощук О.М.

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню маркерів стану печінки щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.

Встановлено, що для тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном характерні виражені зміни морфології печінки, зокрема виявлено ознаки гідропічної дегенерації і некрозу гепатоцитів, виявляються клітини з ознаками запалення. Для окремих гепатоцитів характерна зерниста дистрофія, причиною чого може бути порушення метаболізму і накопичення денатурованих білків. Окрім того, показано підвищення активності АлТ, АсТ, ЛФ, ГГТ, вмісту загального і прямого білірубину, що вказує на виникнення токсичного ураження печінки, зокрема гепатоцелюлярний тип пошкодження гепатоцитів, за умов введення парацетамолу у дозі 1250 мг/кг. У свою чергу введення 20% етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* щурам перед та після моделювання токсичного ураження печінки виявляє захисні ефекти, зокрема активність АлТ, АсТ, ЛФ, ГГТ достовірно знижується, а коефіцієнт де Рітіса – підвищується і наближається до рівня контрольних значень. Водночас спостерігається виражене зниження вмісту загального і прямого білірубину, проте вміст загального білірубину залишається вищим за норму. Аналіз гістологічного зрізу показав зменшення проявів ушкодження гепатоцитів, оскільки у тканині печінки тварин виявляються лише незначні ознаки гідропічної дистрофії.

Ключові слова: ацетамінофен, етанольний екстракт гриба *H. alpestre*, АлТ, АсТ, ЛФ, ГГТ, гістологічний зріз.

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to the study of liver condition markers in rats under acetaminophen-induced intoxication and the administration of the ethanolic extract of the mushroom *hericium alpestre*.

It was established that animals with acetaminophen-induced toxic liver injury exhibit pronounced morphological changes, particularly signs of hydropic degeneration and hepatocyte necrosis, as well as the presence of inflammatory cells. Some hepatocytes show granular dystrophy, which may result from metabolic disturbances and the accumulation of denatured proteins. Moreover, an increase in the activity of alt, ast, alp, and ggt, as well as in the levels of total and direct bilirubin, was observed, indicating the development of toxic liver injury of the hepatocellular type caused by acetaminophen administration at a dose of 1250 mg/kg.

In turn, the administration of a 20% ethanolic extract of *hericium alpestre* to rats before and after modeling toxic liver injury demonstrated protective effects. Specifically, the activities of alt, ast, alp, and ggt significantly decreased, while the de ritis ratio increased and approached control values. At the same time, a marked reduction in total and direct bilirubin levels was observed, although the total bilirubin content remained slightly above normal. Histological analysis showed a reduction in hepatocellular damage, as only minor signs of hydropic degenerat were detected in liver tissue.

Key words: acetaminophen, ethanol extract of the mushroom h. *Alpestre*, ALT, AsT, LF, GGT, histological section.

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

_____ I.C. Шнайдер

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Сучасні уявлення про механізми токсичної дії ацетамінофену.....	7
1.2. Біохімічні маркери ушкодження печінки.....	10
1.2.1. Маркери гепатоцелюлярного ушкодження гепатоцитів.....	10
1.2.2. Лабораторні маркери холестазу	13
1.3. Екстракти грибів як джерело біологічно активних сполук	16
РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	21
2.1. Об'єкти та методи дослідження	21
РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
ВИСНОВКИ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	38
ДОДАТКИ	45

ВСТУП

Захворювання печінки – причина приблизно 2 мільйонів смертей на рік у всьому світі [1], а ліки є одними з потенційних чинників ураження печінки. Захворювання печінки, викликані ліками, становлять до 20% випадків гострої печінкової недостатності у дітей та дорослих. Одним з клінічно важливих препаратів, які здатні уражати печінку, є парацетамол (ацетамінофен, АРАР) – найпоширеніший безрецептурний знеболювальний та жарознижувальний засіб. Передозування парацетамолом може спричинити тяжке ураження печінки, некроз печінки [2] та пошкодження нирок [3] у людей та тварин. У терапевтичних дозах цей препарат метаболізується ферментами цитохрому Р450 з утворенням надзвичайно реактивного метаболіту, відомого як N-ацетил-*p*-бензохінонімін (NAPQI), але цей метаболіт знешкоджується за участі глутатіону (GSH). Однак при передозуванні метаболічна активація парацетамолу за участі цитохрому Р450 спричиняє надмірне утворення реактивного NAPQI, що, у свою чергу, виснажує клітинний пул GSH. Наслідком таких порушень є формування стану оксидативного стресу. Ковалентне зв'язування NAPQI з макромолекулами, зокрема з ДНК, білками, вуглеводами та ліпідами, призводить до їх окислення і, зрештою, до пошкодження печінки. Тому ацетамінофен часто використовують як модельну речовину для експериментального пошкодження гепатоцитів як в умовах *in vivo*, так і *in vitro* [4].

У нашій роботі показано, що “використання сполук природнього походження як нових терапевтичних засобів для корекції гепатотоксичності є багатообіцяючим напрямком у сучасній медицині. Зокрема, біологічно активні сполуки деяких грибів продемонстрували антиоксидантну, протизапальну та регенеруючу дію на гепатоцити, що робить їх цінними кандидатами для зменшення проявів пошкодження печінки, викликаного ліками. Крім того, препарати природнього походження часто мають менше побічних ефектів порівняно з синтетичними препаратами, що підвищує їх привабливість для лікування печінки. Особливу увагу привертають гриби

роду *Hericium*, зокрема *H. alpestre*. Гриб занесений до Червоних списків деяких європейських та азіатських країн, водночас інформація щодо біологічних ефектів екстрактів цього гриба практично відсутня” [5].

Для оцінки ступеня ушкодження печінки використовують лабораторні маркери, які включають певну комбінацію активності аланін- та аспартатамінотрансферази (АлТ, АсТ), лужної фосфатази (ЛФ), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) та інші. Гістологічний аналіз печінки також широко використовується для оцінки гепатопротекторної дії екстрактів та ізольованих сполук [6].

Враховуючи вище сказане, *метою* роботи стало визначення маркерів стану печінки за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.

Для досягнення мети були поставлені наступні *завдання*:

1) визначити у сироватці крові щурів ензиматичну активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, лужної фосфатази та гамма-глутамілтрансферази, а також розрахувати коефіцієнт де Рітіса як маркерів стану печінки за умов введення токсичних доз ацетамінофену та етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* до та після моделювання токсичного ураження печінки;

2) визначити у сироватці крові щурів вміст загального та прямого білірубіну як неензиматичних маркерів функціонального стану печінки за умов введення токсичних доз ацетамінофену та етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* до та після моделювання токсичного ураження печінки;

3) оцінити гістологічний зріз печінки у тварин за умов введення токсичних доз ацетамінофену та етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні уявлення про механізми токсичної дії ацетамінофену

Печінка відіграє ключову роль у метаболізмі поживних речовин, детоксикації та імунній регуляції. Гострі ураження печінки, індуковані інтоксикацією лікарськими препаратами, ішемічно-реперфузійним ураженням, аутоімунними реакціями чи вірусними інфекціями, належать до поширених і потенційно небезпечних для життя станів [7]. Понад 50% випадків гострих уражень печінки пов'язані з широким використанням жарознижувального та знеболювального препарату ацетамінофену. Частота уражень печінки, індукованих ацетамінофеном, щороку зростає, особливо під час пандемії коронавірусної хвороби 2019 року (COVID-19) [8]. Гепатотоксичність цього препарату насамперед зумовлена його реактивним метаболітом, *N*-ацетил-*p*-бензохіноніміном (NAPQI), що утворюється у реакції окислення, опосередкованої цитохромом P450. NAPQI порушує мітохондріальний транспорт електронів і сприяє надмірному продукуванню активних форм кисню (АФК), наслідком чого є мітохондріальна дисфункція та структурні пошкодження. Активні форми кисню та азоту також можуть порушувати клітинний окисно-відновний баланс, викликати запалення, вивільняючи прозапальні цитокіни [9]. Оксидативний стрес активує *c*-Jun *N*-кінцеву кіназу (JNK), запускаючи мітохондріальну транслокацію Bcl-2-асоційованого *X*-білка (BAX) та фосфорильованого JNK (p-JNK), що ще більше посилює продукування активних форм кисню. Це у свою чергу посилює мітохондріальний стрес і призводить до вивільнення цитохрому *C* (Cyt_c), що врешті рещт призводить до апоптозу гепатоцитів. Внаслідок загибелі гепатоцитів вивільнюються молекули, що активують макрофаги та ініціюють прозапальний каскад.

Препарат трансформується в реактивні метаболіти під час метаболізму I фази, при цьому гідроксильні, карбоксильні, аміно- або тіольні групи реагують з білками [10]. NAPQI також швидко зв'язується з глутатіоном, виснажуючи його запаси [11]. Коли рівень GSH у печінці обмежений,

вільний некон'югований NAPQI реагує з сульфгідрильними групами, утворюючи білкові аддукти, накопичення яких вважаються ключовими для виникнення гепатотоксичності. При цьому порушується робота комплексів I/II мітохондріального електронтранспортного ланцюга та спостерігається витік електронів до O_2 з утворенням $O_2^{\cdot-}$. NAPQI також взаємодіє з мітохондріальною ДНК-мішенню та білками, а також з білковими аддуктами. Це у свою чергу призводить до оксидативного стресу, мітохондріальної дисфункції та викликає некроз гепатоцитів, запалення та імунну відповідь [12].

У основі гепатотоксичної дії ацетамінофену лежить мітохондріальна дисфункція. Серед варіантів порушень структури та функцій мітохондрій розрізняють морфологічні та структурні зміни, порушення енергетичного обміну, підвищення рівня активних форм кисню, пошкодження мітохондріальної ДНК та порушення мітофагії [13]. Окрім того, за умов передозування ацетамінофеном також спостерігається посилення нітрування залишків тирозину білків, активація індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) та посилене утворення пероксинітриду ($ONOO^-$). $ONOO^-$ утворюється в мітохондріях і знешкоджується шляхом взаємодії з GSH. Тому при передозуванні ацетамінофеном, що супроводжується зменшенням кількості відновленого глутатіону, спостерігається накопичення $ONOO^-$. Висока реакційна здатність та виражена окислювальна дія $ONOO^-$ спричиняють пошкодження мтДНК та відкриття пор мітохондріальної мембрани [14]. Надлишок $ONOO^-$ також може безпосередньо реагувати з вуглекислим газом, утворюючи сполуки, які далі розкладаються з утворенням радикалів $CO_3^{\cdot-}$ та OH^{\cdot} , що реагують з іонами металів, посилюючи гепатотоксичність [15].

Мітохондріальна дисфункція запускає некроз клітин; внаслідок загибелі гепатоцитів вивільняються різні ендогенні молекулярні структури, що опосередковують пошкодження. Активація інфламасом макрофагів печінки, індукована цими молекулами, може відбуватися через шлях Toll-подібного

рецептора (TLR). Коли Toll-подібні рецептори (TLR) зв'язуються своїми лігандами, вони запускають утворення інфламасом, що призводить до транскрипційної активації про-IL-1 β та вивільнення активних IL-1 β та IL-18, що свідчить про те, що активація інфламасоми є початком стерильного запалення [16]. Вроджена імунна система додатково активується вивільненням IL-1 β та IL-18, що призводить до збільшення продукування прозапальних цитокінів або хемокінів [17]. Цю концепцію підтверджують підвищені рівні запальних факторів у плазмі у пацієнтів, які надмірно використовують ацетамінофен, або у лабораторних тварин з передозуванням АРАР. Крім того, в імунній відповіді, опосередкованій гепатотоксичністю АРАР, клітини Купфера формують першу лінію захисту, розпізнаючи молекулярні структури, що вивільняються з некротичних клітин печінки. Після активації ці клітини вивільняють цитокіни, такі як IL-6, інтерферон (IFN), фактор некрозу пухлини (TNF) та хемокіни. Ці цитокіни залучають та активують нейтрофіли та моноцити, підвищуючи регуляцію молекул адгезії на синусоїдальних ендотеліальних клітинах печінки та гепатоцитах. Індукуючи експресію медіаторів запалення та молекул адгезії, вони допомагають нейтрофілам адгезувати та трансмігрувати всередині синусоїдів, адгезувати до клітин-мішеней та індукувати оксидативний стрес для регуляції агрегації імунних клітин, що призводить до загибелі гепатоцитів. Відомо [18], що надмірний вплив ацетамінофену зменшує пул ендогенних антиоксидантів, стимулює утворення активних форм кисню, підвищує проникність мітохондріальних мембран та виснажує запаси АТФ, що зрештою призводить до пошкодження печінки. Nrf2 – це транскрипційний фактор, який може зв'язуватися з елементом антиоксидантної відповіді (ARE), регулюючи експресію різних внутрішньоклітинних антиоксидантів. Високі дози АРАР можуть активувати шлях NF- κ B, посилюючи вироблення АФК. NF- κ B вважається основним транскрипційним фактором, що сприяє експресії прозапальних цитокінів та інших медіаторів у запальних та окислювальних реакціях.

1.2. Біохімічні маркери ушкодження печінки

1.2.1. Маркери гепатоцелюлярного ушкодження гепатоцитів

Печінка відіграє центральну роль в метаболізмі вуглеводів, білків та жирів, а також у знешкодженні продуктів метаболізму. Вона відповідає за синтез та секрецію жовчі, а також за синтез ліпопротеїнів та білків плазми, включаючи фактори згортання крові; підтримує стабільний рівень глюкози в крові, поглинаючи та зберігаючи глюкозу у вигляді глікогену [6]. Токсини та ліки є одними з основних етіопатогенетичних агентів гострої печінкової недостатності [19]. Для оцінки функціонального стану печінки використовують стандартний набір аналітів крові, що дозволяє отримати інформацію про стан пацієнта [20]. Ці тести включають визначення активності деяких ферментів або вмісту сполук, таких як аланінамінотрансфераза (АлТ), аспаратамінотрансфераза (АсТ), лужна фосфатаза (ЛФ) та білірубін [21]. Ці тести використовуються для дослідження при підозрі на ураження печінки різними чинниками або моніторингу прогресування захворювання.

До амінотрансфераз належать АлТ і АсТ, які є маркерами гепатоцелюлярного ушкодження. Ці ферменти каталізують реакції трансамінування і забезпечують перенесення аміногруп з аспарагінової кислоти або аланіну до кетоглутарової кислоти для отримання відповідно оксалоацетату та пірувату. АсТ присутній в печінці, серцевому та скелетних м'язах, нирках, мозку, підшлунковій залозі, легенях, лейкоцитах та еритроцитах. Він не настільки чутливий або специфічний для печінки, як АлТ. У новонароджених та немовлят активність АсТ приблизно вдвічі перевищує показники дорослих, проте знижується на норми дорослих приблизно у півроку [22].

АлТ виявляється у більш високих концентраціях у печінці, і будь-який тип ушкодження клітин печінки може призвести до підвищення рівня АлТ у сироватці крові. АлТ – це цитозольний фермент, період напіввиведення АлТ становить приблизно 47 ± 10 годин. Активність АлТ, як правило, вища, ніж

АсТ у більшості випадків захворювань печінки. Гепатоцелюлярне ушкодження (не обов'язково загибель клітин) запускає вивільнення цих ферментів у кровообіг. Показники АсТ і АлТ вищі у чоловіків, ніж у жінок, а також вищі у пацієнтів з ожирінням [23]. Підвищені рівні АсТ спостерігаються при інфаркті міокарда, дегенерації тканин печінки та некрозі. АсТ існує як у цитозольній (20%), так і в мітохондріальній (80%) формах у багатьох органах, тоді як АлТ переважно локалізована у цитозолі та специфічна для печінки. При ранньому пошкодженні печінки (співвідношення АсТ/АлТ < 3,6) внаслідок зміни проникності мембран переважно вивільняються у кров цитозольні ферменти. При прогресуванні пошкодження мітохондрій печінки вивільняється у кров мітохондріальна АсТ, що свідчить про перехід до значного некрозапального пошкодження [24]. Підвищене співвідношення АсТ/АлТ вказує на мітохондріальну дисфункцію та підвищений оксидативний стрес, що сприяє поліорганному пошкодженню у критично хворих пацієнтів. Крім того, рівні АсТ/АлТ позитивно корелюють із запальними маркерами, включаючи С-реактивний білок (СРБ), ІЛ-4, ІЛ-6 та ФНП- α [25], потенційно посилюючи запальні реакції [26].

Підвищення рівня АсТ і АлТ менше ніж удвічі порівняно з нормою визначається як легка форма ураження печінки, від 2 до 5 разів – як помірна, від 5 до 15 разів – як тяжка, і у понад 15 разів – як масивна гепатоцелюлярна травма [27].

Ген, який кодує цитозольну аланінамінотрансферазу 1 (АлТ1), також відомий як глутамат-піруват-трансаміназа 1, розташований у хромосомі 8 (8q24.3) і має 11 екзонів. Цей фермент каталізує оборотну реакцію трансамінування між аланіном та 2-оксоглутаратом з утворенням пірувату та глутамату, відіграючи ключову роль у метаболізмі глюкози та амінокислот. Алт1 експресується в печінці, нирках, серці та скелетних м'язах, і на помірному рівні – в жировій тканині. АлТ2 кодується іншим геном, який розташований у хромосомі 16 (16q12.1). мРНК експресується на високому рівні в м'язах,

жировій тканині, нирках та мозку, практично не експресується у печінці. Згідно з наявними доказами, АлТ1 та АлТ2 мають не лише різне джерело тканин, але й клітинну локалізацію, що говорить про різний біологічний сенс у контексті гострого або хронічного патогенезу захворювання печінки. Наприклад, у печінці АлТ1 локалізується лише в цитозолі та ендоплазматичному ретикулумі, та відсутня в мітохондріях. Існуючі біохімічні тести, спрямовані на вимірювання АлТ в крові, не здатні визначити походження цього ензиму, проте показано, що у крові переважно циркулює АлТ1 [28]. Цікаво, що підвищення рівня АлТ не обов'язково свідчить про гепатоцелюлярне ураження. Kechagias та ін. [29] показали, що споживання фаст-фуду в поєднанні з малорухливим способом життя призводило до патологічного підвищення рівня АлТ. Зокрема, автори показали, що значне підвищення амінотрансфераз (до 447 Од/л), не пов'язані з розвитком стеатозу печінки, а є адаптивною реакцією на метаболічні потреби печінки.

Незважаючи на зв'язок між значно підвищеними рівнями АлТ та його специфічністю до гепатоцелюлярних захворювань, абсолютний пік висоти АлТ не корелює зі ступенем пошкодження клітин печінки. Причиною помітного підвищення рівня амінотрансферази може бути вірусний гепатит, при цьому у пацієнтів з гострим гепатитом С у сироватці крові високий рівень цього ферменту зберігається протягом 1 – 2 років. Якщо після виникнення гострого гепатиту активність АлТ зберігається підвищеною протягом 6 місяців, говорять про хронічний гепатит. Підвищення рівня АлТ характерне для пацієнтів з неалкогольним стеатогепатитом. Окрім того, підвищений рівень АлТ був пов'язаний зі зниженою чутливістю до інсуліну, вмістом адипонектину та толерантністю до глюкози, а також з підвищенням вмісту вільних жирних кислот та триацилгліцеролів. Рівень АлТ також підвищується протягом 2-го триместру при безсимптомній нормальній вагітності. Одне з недавніх досліджень показало, що споживання кави та кофеїну знижує ризик підвищеної активності АлТ у сироватці крові при надмірному споживанні

алкоголю, вірусному гепатиті, перевантаженні залізом, надмірній вазі та порушенні метаболізму глюкози [30].

У нормі активність АсТ у сироватці крові становить від 0 до 35 Од/л. Підвищення мітохондріальної форми АсТ спостерігається при значному некрозі тканин під час інфаркту міокарда, а також при хронічних захворюваннях печінки, таких як дегенерація тканин печінки та некроз. Співвідношення мітохондріальної АсТ до загальної активності амінотрансфераз має діагностичне значення для виявлення некрозу клітин печінки та алкогольного гепатиту. Підвищення АсТ часто виявляють у пацієнтів з цирозом і навіть при захворюваннях печінки, які зазвичай мають підвищений АлТ.

Співвідношення АсТ до АлТ, або коефіцієнт де Рітіса, має більшу діагностичну цінність, ніж оцінка індивідуального підвищеного рівня ензимів. Співвідношення пропорційне прогресуючому функціональному порушенню печінки, чутливість цього показника складає 81,3%, а специфічність – 55,3% (у пацієнтів з цирозом). Середнє співвідношення складало 1,45 та 1,3 відповідно при алкогольних захворюваннях печінки та після цирозу. Підвищене співвідношення, що перевищує 1, може вказувати на фіброз печінки та хронічний гепатит С. Однак співвідношення АсТ/АлТ, що перевищує 2, характерно для пацієнтів з алкогольним гепатитом. У пацієнтів з неалкогольним стеатогепатитом коефіцієнт де Рітіса складав 0,9, тоді як у хворих з алкогольною хворобою печінки – 2,6 [31].

1.2.2. Лабораторні маркери холестазу

Лужна фосфатаза (ЛФ, ЕС 3.1.3.1) належить до родини цинк-вмісних металоензимів, які присутні в тонкому кишечнику, проксимальних каналцях нирок, кістках, печінці та плаценті. Існує чотири ізоферменти ЛФ: плацентарна, ЛФ зародкових клітин, кишкова ЛФ та тканинно-неспецифічна ЛФ [32]. Це глікопротеїни, зв'язані з плазматичною мембраною, що гідролізують різні ефіри монофосфату при високому оптимальному рН з

вивільненням неорганічного фосфату. Для прояву ферментативної активності необхідні три іони металів, зокрема два Zn^{2+} і один Mg^{2+} [33].

Незначне підвищення активності ЛФ спостерігається при таких станах як цироз, гепатит та застійна серцева недостатність. Підвищення в сироватці корелює з захворюваннями кісток, печінки тощо [34]. Високий рівень ЛФ може свідчити про ураження жовчних проток. У дітей та вагітних жінок рівень ЛФ підвищений, що може вказувати на активне формування кісток, оскільки цей ензим активно вивільняється при роботі остеобластів, при гіперпаратиреозі, дефіциті вітаміну D або пошкодженні клітин печінки.

При гострому вірусному гепатиті ЛФ зазвичай зберігається у межах норми або незначно підвищується. Підвищення ЛФ спостерігається при гепатиті, що супроводжується холестазом. Печінкові та кісткові метастази також можуть спричинити підвищення рівня ЛФ. Підвищення ЛФ характерне для таких станів як інфільтративні захворювання печінки, абсцеси, гранульоматозні захворювання печінки та амілоїдоз, цироз, застійна серцева недостатність. Низький рівень ЛФ спостерігається при гіпотиреозі, анемії, дефіциті цинку та вродженій гіпофосфатазії. Оскільки підвищення рівня ЛФ у сироватці крові може спостерігатися при різних патологічних станах, то для диференційної діагностики захворювань печінки та кісткових розладів визначають активність гамма-глутамілтрансферази, оскільки активність цього ензиму підвищується лише при холестатичних розладах, а не при захворюваннях кісток.

Гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ) розташована на мембранах клітин з високою секреторною або поглинальною активністю. Основна функція цього ферменту полягає у каталізі перенесення гамма-глутамільної групи з глутатіону до інших амінокислот. ГГТ локалізована у печінці, нирках, підшлунковій залозі, кишечнику, простаті, яєчках, селезінці, серці та мозку. При біліарних захворюваннях ГГТ є більш специфічним порівняно з лужною фосфатазою, оскільки його немає в кістках. Визначення активності ГГТ дозволяє диференціювати дві форми ідіопатичного холестазу, з участю

жовчних проток або без них [35]. Будь-яке захворювання печінки, що призводить до фіброзу та/або цирозу, спричиняє підвищення вмісту ГГТ у крові. Окрім того, підвищення ГГТ у крові також спостерігається при злоякісних утвореннях печінки або метастазах у печінку, гранулематозних захворюваннях, наприклад, саркоїдозі та туберкульозі.

У нормі рівень ГГТ становить від 9 до 85 Од/л. При гострому вірусному гепатиті рівень ГГТ досягає піку на другому чи третьому тижні хвороби, а у деяких пацієнтів залишається підвищеним протягом 6 тижнів. Підвищений рівень спостерігається приблизно у 30% пацієнтів із хронічним гепатитом С. Проте підвищення рівня ГГТ також може спостерігатися при інших станах, зокрема неускладненому цукровому діабеті, гострому панкреатиті, інфаркті міокарда, нервовій анорексії, гіпертиреозі, ожирінні тощо. Підвищення рівня ГГТ у сироватці крові у понад 10 разів спостерігається при зловживанні алкоголем. Частково це пов'язано з структурними пошкодженнями печінки, індукцією мікросомального ферменту печінки або ушкодженням алкоголем підшлункової залози. Рівень ГГТ може в 2 – 3 рази перевищувати верхню межу норми у понад 50% пацієнтів із неалкогольною хворобою жирної печінки. Також показано, що існує позитивна кореляція між рівнем ГГТ та триацилгліцеролів у сироватці крові при діабеті. Основна перевага визначення активності ГГТ полягає у виключенні захворювань кісток, оскільки цей ензим не характерний для кісткової тканини [36].

Білірубін – це кінцевий продукт катаболізму гему, 80 % походить із гемоглобіну. Некон'югований білірубін транспортується до печінки у комплексі із альбуміном, оскільки є ліпофільним і не може бути виведений із сечею. Він кон'югується в печінці з глюкуронідом і згодом секретується в жовч і кишку. Кон'югований білірубін є водорозчинним і виводиться із сечею [37].

Вміст загального білірубіну у сироватці крові коливається від 2 до 21 мкмоль/л. У нормі вміст непрямого (некон'югованого) білірубіну складає

менше 12 мкмоль/л, а прямого (кон'югованого) білірубіну – менше 8 мкмоль/л [36]. Якщо рівень білірубіну в сироватці крові перевищує 17 мкмоль/л, то це свідчить про захворювання печінки. При концентрації білірубіну крові близько 40 мкмоль/л, спостерігається поява жовтяниці, зокрема пожовтіння склери, шкіри та слизових оболонок.

Жовтяниця виникає, коли білірубін стає помітним у склері, шкірі та слизових оболонках, при концентрації у крові близько 40 мкмоль/л. Підвищення рівня некон'югованого білірубіну може виникати через надмірне його утворення та/або зменшення поглинання та кон'югації у печінці. Такі зміни можуть спостерігатися при генетичному дефекті UDP-глюкуронілтрансферази. При вірусному гепатиті, гепатоцелюлярному, токсичному або ішемічному ушкодженні печінки спостерігається підвищення рівня кон'югованого білірубіну. Гіпербілірубінемія при гострому вірусному гепатиті безпосередньо пропорційна до ступеня гістологічного ушкодження гепатоцитів та тривалості перебігу захворювання. При паренхіматозних захворюваннях печінки або неповній позапечінковій обструкції рівень білірубіну в сироватці крові буде нижчим порівняно з злоякісною обструкцією загальної жовчної протоки, але рівень залишається нормальним при інфільтративних захворюваннях, таких як пухлини та гранульома.

1.3. Екстракти грибів як джерело біологічно активних сполук

Нині кількість різних видів грибів на Землі оцінюється приблизно в 140000, з них лише 10% видів вже описано, і близько 2000 з них є їстівними. Менше 25 видів використовують як продукти харчування, і їх вирощують у промислових масштабах. Як їжа, гриби цінуються у всьому світі за свій смак і аромат, і їх споживають як у свіжому, так і в обробленому вигляді. Вони низькокалорійні та багаті на білки, клітковину, вуглеводи та важливі вітаміни, такі як тіамін, рибофлавін, аскорбінова кислота та мінерали [38]. Дослідження показали, що регулярне споживання грибів або споживання виділених із них біологічно активних компонентів, корисне для здоров'я. Зазвичай їх вважа-

ють функціональними продуктами харчування або нутрицевтичними продуктами [39]. Термін «нутрицевтик» зазвичай використовується для опису тих речовин або комбінацій речовин, які мають значний потенціал як харчові добавки та для використання для профілактики чи лікування різних захворювань людини без деяких побічних ефектів, що часто супроводжують використання синтетичних препаратів. Зокрема, грибний нутрицевтик – це рафінований/частково рафінований екстракт з міцелію або базидіоми та аскоми, який вживається у формі капсул або таблеток як харчова добавка (не як звичайна їжа) з потенційним терапевтичним впливом [40]. Лікувальні гриби мають давню історію використання в традиційній східній медицині, а метаболіти грибів все частіше використовуються для лікування широкого спектру захворювань [41]. Крім того, їстівні гриби не слід розглядати просто як їжу, оскільки деякі з них, як було показано, багаті на біологічно активні сполуки. Гриби містять багато речовин, і деякі з них можуть мати певну біологічну активність. До цих сполук належать полісахариди, феноли, білки (грибкові імуномодулюючі білки – FIP, лектини, глікопротеїни та неглікозильовані білки та пептиди), полісахаридно-білкові комплекси, ліпідні компоненти (ергостерол) та терпеноїди, алкалоїди, малі пептиди та амінокислоти, нуклеотиди та нуклеозиди. Тому екстракти грибів здатні проявляти різні біологічні властивості, зокрема антиоксидантну, протипухлинну, антимікробну, імуномодулюючу, протизапальну, антиатерогенну та гіпоглікемічну дію. Крім того, також повідомлялося про гепатопротекторні властивості екстрактів грибів та молекул, отриманих з грибів [42].

Вплив біологічно активних речовин їстівних та лікарських грибів на функції печінки досліджувався переважно шляхом годування тварин цілими грибами з неочищеними екстрактами або шляхом інкубації препаратів тканини печінки з повними або напівочищеними екстрактами. Були оцінені водно-спиртові, спиртові та водні екстракти як з грибних базидіом, так і з міцелію. Водні екстракти *Volvariella volvacea*, *Lentinula edodes*, *Flammulina*

velutipes, *Auricularia auricularia*, *Tremella fuciformis*, *Grifola frondosa* та *Tricholoma lobayense* були досліджені на предмет їхньої гепатопротекторної активності, використовуючи парацетамол-індуковане ураження печінки (دوزи 1,0 г/кг маси тіла) у щурів як модель хімічного гепатиту. Результати ферментативних аналізів показали, що парацетамол викликає гостру печінкову токсичність, що призводить до значного підвищення рівнів сироваткових трансаміназ (АСТ та АЛТ). Екстракти базидіом *L. edodes* та *G. frondosa* (100 мг/кг маси тіла) мали дуже значний гепатопротекторний ефект, зменшуючи парацетамол-індуковане гостре підвищення рівнів АСТ та АЛТ, тоді як міцеліальний водний екстракт *T. lobayense* проявляв гепатопротекторну активність лише у вищій дозі 300 мг/кг маси тіла. Екстракти інших чотирьох грибів не знижували рівні цих трансаміназ у сироватці крові. Як можливі механізми гепатопротекторної дії екстрактів *L. edodes*, *G. frondosa* та *T. lobayense* було запропоновано кілька шляхів:

- збереження структурної цілісності мембран гепатоцитів;
- запобігання зниженню рівнів GSH шляхом впливу на ферменти, що беруть участь в окисно-відновному циклі GSH;
- знешкодження вільних радикалів, що утворюються внаслідок метаболізму парацетамолу, що може бути зумовлене антиоксидантними сполуками екстрактів грибів [6].

Багато біологічно активних сполук харчового походження, такі як каротиноїди, флавоноїди, сапоніни та терпени, мають профілактичний та терапевтичний вплив на уражену печінку завдяки своїй сильній антиоксидантній, протизапальній, антиапоптотичній, аутофагій-індукуючій та фероптоз-інгібуючій дії. З огляду на зростання глобальної захворюваності на патології печінки, визначення природних джерел сполук з терапевтичною активністю, зокрема продуктів харчування, стало актуальним напрямком досліджень. Тим не менш, такі питання, як побічні ефекти біологічно активних сполук, низька розчинність та біодоступність, потребують їх вирішення щодо сполук харчового походження [43].

Гриби є основними джерелами природних активних пептидів зі значною ефективністю, високою спорідненістю до тканин, низькою токсичністю та високою стабільністю. Аналіз рівнів GSH у різних видах грибів показав, що вміст GSH у майтаке був вищим, ніж у більшості фруктів та овочів, що вказує на те, що гриби можуть бути незамінним джерелом GSH у щоденному раціоні.

Поліфеноли, що складаються щонайменше з одного ароматичного кільця з гідроксильними функціональними групами, включаючи флавоноїди, фенольні кислоти, стильбени та лігнани, є природними антиоксидантами. Поліфеноли можуть постачати електрони або атоми водню для нейтралізації вільних радикалів або хелатувати з іонами металів, щоб зменшити швидкість реакції Фентона. Гриб *Agaricus brasiliensis*, що містить фенольні сполуки, такі як галова кислота, пірогалол, може інгібувати утворення активних форм кисню макрофагами, стимульованими трет-бутилпероксидом водню. Флавоноїди, очищені з *Flammulina velutipes*, значно підвищили рівень глутатіону, а активність SOD ефективно гальмувала внутрішньоклітинне накопичення активних форм кисню (AFO) [44].

Полісахариди, поліпептиди та поліфеноли є основними антиоксидантними сполуками в грибах, тоді як інші сполуки, включаючи білки, терпени, ацени та ліпіди, як правило, мають менш виражені антиоксидантні властивості. Антиоксидантні властивості сполук, очищених з грибів, залежать від виду, екстрагованих частин та методів очищення. Дослідники всебічно вивчали полісахариди, пептиди та фенольні сполуки, в той час як дослідження, зосереджені на білках, терпеноїдах, аценах та жирних кислотах, обмежені [45].

Отже, багато екстрактів грибів виявляють гепатопротекторні властивості, спричиненого токсичними хімічними речовинами. Гриби можуть представляти нову альтернативу обмеженим терапевтичним можливостям, які існують наразі для лікування захворювань печінки або їх симптомів, і їх слід розглядати як такі в майбутніх дослідженнях. Загалом, феноли, тритерпени,

полісахариди та пептиди є основними класами сполук, які можуть бути відповідальними за гепатопротекторну активність екстрактів грибів. На жаль, точна ідентифікація конкретних молекул, що беруть участь в гепатопротекторному ефекті, є недостатньою. Ця галузь все ще вимагає значних зусиль. Потужна гепатопротекторна активність хімічно визначених молекул, виділених з природних матеріалів, може бути перспективною для пошуку ефективних засобів захисту печінки, особливо зараз, коли існує нагальна потреба в нових інноваційних препаратах. Інша перспектива випливає з нещодавнього дослідження, в якому вивчався гепатопротекторний вплив екстракту *Agaricus blazei* на пошкодження, викликане парацетамолом. Було виявлено, що екстракт досить ефективно нормалізує кілька класичних маркерів пошкодження печінки, таких як вивільнення ферментів у плазму та рівень пероксидного окислення ліпідів [6].

Отже, необхідно провести подальші дослідження, щоб переконатися в безпеці цих сполук як хороших альтернатив традиційним препаратам у лікування захворювань печінки.

РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Об'єкти та методи дослідження

Досліди проводили на білих безпородних лабораторних щурах віком 3 – 4 місяці та вагою 200 – 250 г. Тварин утримували у пластикових клітках із піщаною підстилкою, забезпечуючи постійний доступ до води (*ad libitum*) [46]. Всі експериментальні процедури виконували відповідно до вимог Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин та положень Біоетичної експертизи досліджень на тваринах.

Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи:

I група – контрольні тварини (К);

II – щури, яким вводили *per os* 20 % екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла протягом 10 діб (ЕГА);

III – тварини з гострим токсичним ураженням ацетамінофеном (ТУ);

IV – тварини, яким перед моделюванням ацетамінофен-індукованого ураження протягом 10 діб вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла (ЕГА+ТУ);

V – тварини, яким після моделюванням ацетамінофен-індукованого токсичного ураження протягом 7 діб вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 500 мкг/кг маси тіла (ТУ + ЕГА).

Моделювання ацетамінофен-індукованого ураження здійснювали шляхом введення *per os* ацетамінофену в дозі 1 г/кг маси тварин у 2 %-й крохмальній суспензії протягом 2 діб через 24 год за допомогою спеціального зонда [46].

Приготування етанольного екстракту плодових тіл грибів *Hericium alpestre*

У даному дослідженні вивчався гриб *Hericium alpestre*, наданий Національним природничим парком «Гуцульщина» в рамках договору про співпрацю з кафедрою біохімії та біотехнології ЧНУ імені Ю. Федьковича.

Екстракцію виконували за модифікованим методом [47]. Для отримання етанольного екстракту порошкоподібний гриб (5 г), попередньо висушений і подрібнений, змішували з 50 мл 70% етанолу та інтенсивно струшували при 150 об/хв протягом 24 годин за кімнатної температури. Після цього суміш центрифугували при 12000 об/хв протягом 15 хвилин. Отриманий супернатант фільтрували через фільтрувальний папір марки Ватман і збирали фільтрат. Осад піддавали повторній екстракції за тих самих умов. Концентрування екстракту проводили під вакуумом при 40 °С на роторному випарнику Labfreez RE-2000E. Отриманий зразок зберігався в темному місці при 4 °С [46].

Для оцінки гепатопротекторної активності готували 20 % екстракт *Hericium alpestre* у концентрації 200 та 500 мкг/кг маси тіла.

Отримання сироватки крові щурів

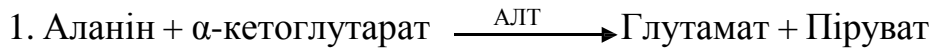
Кров відбирали з ворітної вени печінки тварин у пробірки, які потім центрифугували на лабораторній центрифусі 82-А при 1500 об/хв протягом 10 хвилин. Після центрифугування за допомогою піпетки відбирали сироватку, що складала приблизно 50% від первинного об'єму крові.

Ензиматичні активності аланінамінотрансферази (АлТ), аспартатамінотрансферази (АсТ), лужної фосфатази (ЛФ) та гамма-глутамілтранспептидази (ГГТ), а також концентрації загального та прямого білірубину у сироватці крові визначали на біохімічному аналізаторі BiochemFC-120 (High Technology Inc., North Attleboro, MA, USA), при цьому коефіцієнт де Рітиса розраховували як співвідношення активностей АсТ до АлТ для оцінки характеру печінкового ураження.

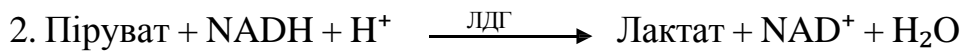
Визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові

Активність АлТ у сироватці крові тварин визначали відповідно до інструкції виробника High Technology, Inc.

Аланінамінотрансфераза (АЛТ; КФ 2.6.1.2), каталізує перенесення аміногрупи з аланіну на α -кетоглутарат з утворенням глутамату та пірувату.



Під дією лактатдегідрогенази (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) піруват відновлюється до лактату, при цьому NADH окислюється до NAD^+ , а протон H^+ включається в реакцію, утворюючи воду.



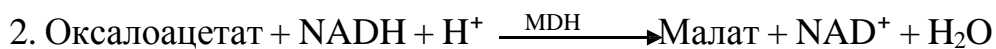
Принцип методу заснований на фотометричному визначенні швидкості зменшення концентрації NADH, що безпосередньо відображає активність АЛТ у зразку.

Визначення активності аспартатамінотрансферази у сироватці крові

Загальну активність АСТ у сироватці крові щурів визначали відповідно до інструкції виробника High Technology, Inc.

Принцип методу визначення аспартатамінотрансферази (АСТ; КФ 2.6.1.1), полягає в каталізі перенесення аміногрупи з аспартату на α -кетоглутарат з утворенням глутамату та оксалоацетату.

1. L-Аспартат + α -Кетоглутарат $\xrightarrow{\text{АСТ}}$ Глутамат + Оксалоацетат У подальшій реакції оксалоацетат відновлюється до малату за участю малатдегідрогенази (МДГ; КФ 1.1.1.37), при цьому відбувається окиснення NADH до NAD^+ .



Зниження концентрації NADH, що реєструють фотометрично, прямопропорційне активності АСТ у зразку.

Визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові

Лужна фосфатаза (ЛФ; КФ 3.1.3.1) каталізує реакцію перенесення фосфатної групи з *n*-нітрофенілфосфату на 2-аміно-2-метил-1-пропанол (АМР).

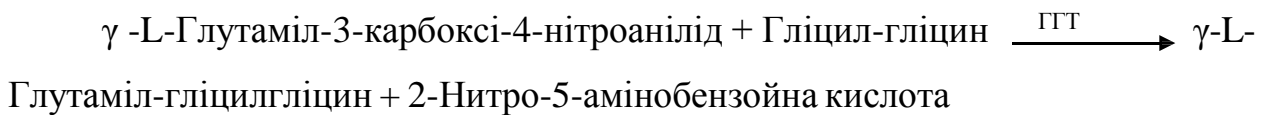


У результаті реакції утворюється *n*-нітрофенол і фосфат, причому швидкість утворення *n*-нітрофенолу прямо пропорційна активності ферменту.

Реакція відбувається при лужному рН і контролюється фотометрично – за збільшенням оптичної густини розчину, що відповідає кількості утвореного *p*-нітрофенолу. Це дозволяє кількісно оцінити активність лужної фосфатази в зразку сироватки крові.

Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази у сироватці крові

Гамма-глутамілтрансфераза (ГГТ; КФ 2.3.2.2.) каталізує реакцію перенесення γ -L-Глутамілу від γ -L-Глутаміл-3-карбокси-4-нітроаніліду до гліцил-гліцину:



Інтенсивність утворення 2-нітро-5-амінобензойної кислоти вимірюють фотометрично, при довжині хвилі 405 нм і швидкість збільшення її концентрації прямопропорційна активності ферменту γ -ГТ у досліджуваному зразку.

Визначення вмісту загального білірубіну у сироватці крові

Методику визначення загального білірубіну в сироватці проводили згідно до інструкції High Technology, Inc. Білірубін вступає в реакцію з діазотованою сульфаніловою кислотою, внаслідок чого утворюється азобілірубін, який проявляє максимум світлопоглинання при довжині хвилі 560 нм у розчині диметилсульфоксиду (ДМСО). Інтенсивність отриманого забарвлення прямопропорційна з концентрацією загального білірубіну у досліджуваному зразку.

Визначення вмісту прямого білірубіну у сироватці крові

Прямий білірубін вступає в реакцію з діазотованою сульфаніловою кислотою, утворюючи азобілірубін, який має максимум світлопоглинання при 560 нм у водному розчині.

Інтенсивність забарвлення реакційної суміші прямопропорційна концентрації прямого білірубіну у досліджуваному зразку, що дозволяє кількісно визначити його рівень. Метод проводили згідно інструкції High Technology, Inc.

Аналіз гістологічного зрізу печінки

Відібрані печінкові зразки двічі промивали холодним фосфатно-сольовим буфером для видалення залишків крові та метаболітів. Потім тканини фіксували у 10% розчині формальдегіду з метою подальшого гістопатологічного дослідження. Після фіксації та стандартної обробки зрізи печінки забарвлювали гематоксиліном і еозином. Отримані гістологічні препарати всіх експериментальних груп тварин оцінювали під мікроскопом, звертаючи увагу на структурні зміни паренхіми, наявність запальних інфільтратів, некрозів та інших морфологічних порушень [48].

Статистичний аналіз даних

Аналіз отриманих експериментальних даних проводили з використанням стандартних методів варіаційної статистики. Порівняння показників між дослідними групами та контрольною групою здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel, застосовуючи двовибірковий t-тест Стьюдента для незалежних вибірок. Різницю між групами вважали статистично значущою при рівні ймовірності $P \leq 0,05$ [46].

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З моменту виявлення, що парацетамол може викликати токсичне ушкодження, моделювання ацетамінофен-індукованого ураження тварин використовується для вивчення того, чи мають різні фітохімічні речовини, екстракти рослин чи грибів гепатопротекторний ефект [49]. Індуковане ушкодження клітин печінки повинно дати можливість дослідникам оцінити ступінь пошкодження печінки та ефективність сполук з потенційною терапевтичною дією. Для моделювання токсичного ураження у мишей використовують дозу ацетамінофену 300 – 500 мг/кг, тоді як у моделях щурів вона становить від 1 – 2 г/кг. При цьому рекомендовано моделювання токсичного ураження здійснювати шляхом перорального введення [49].

Для скринінгу та моніторингу токсичного ураження використовують набір лабораторних маркерів, які включають аланінамінотрансферазу (АлТ), аспартатамінотрансферазу (АсТ) [50], лужну фосфатазу (ЛФ) і загальний білірубін. Рівень сироваткової аланінамінотрансферази зазвичай використовується як надійний біохімічний маркер для оцінки раннього ушкодження печінки. Основними характеристиками гепатоцелюлярного ураження печінки є некроз гепатоцитів, інфільтрація лімфоцитів та еозинофілів у печінці, легкий застій жовчі, запальна реакція, значне підвищення рівня АсТ та АлТ у сироватці крові, а також помірне підвищення рівня гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) та ЛФ [51]. ЛФ може слугувати специфічним показником холестатичного ураження печінки та важкого токсичного ураження, а вміст загального білірубину безпосередньо відображає функції печінки, що робить його важливим параметром для постановки та прогностичної оцінки токсичного ураження.

Результати проведених досліджень показали, що у щурів, яким вводили ацетамінофен у дозі 1250 мг/кг, виникає токсичне ураження печінки. Про це свідчить достовірне підвищення ензиматичної активності АлТ (рис. 3.1) та

АсТ (рис. 3.2) у сироватці крові, а також зниження коефіцієнта де Рітиса (рис. 3.3), що є маркерами гепатоцелюлярного ураження печінки.

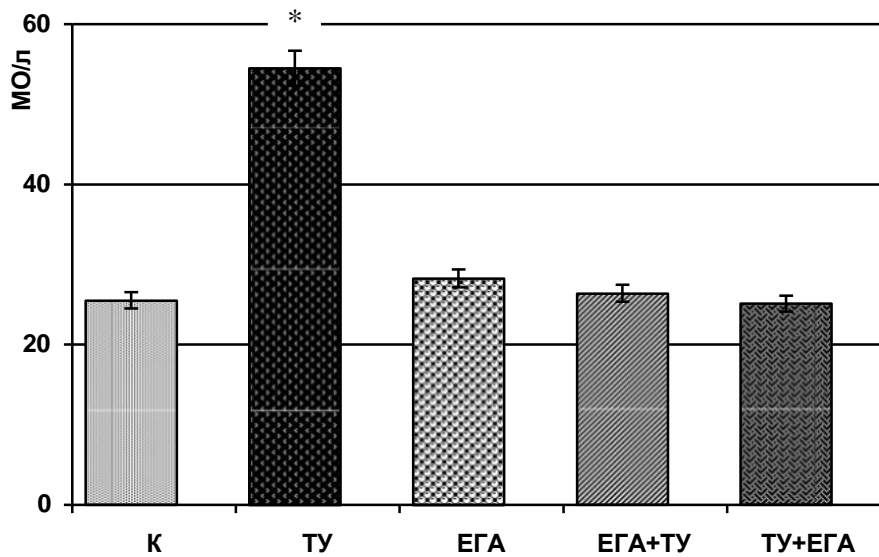


Рис. 3.1. Аланінамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

Примітка (тут і надалі): К – контрольні тварини; ТУ – тварини, яким моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном; ЕГА – щури, яким вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла протягом 10 діб; ЕГА+ТУ – тварини, яким перед моделюванням гострого ацетамінофен-індукованого токсичного ураження протягом 10 діб вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла; ТУ + ЕГА – тварини, яким перед моделюванням гострого ацетамінофен-індукованого токсичного ураження протягом 10 діб вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 500 мкг/кг маси тіла.

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

Відомо, що АлТ і АсТ при ушкодженні цілісності мембран гепатоцитів та підвищенні їх проникливості потрапляють у кров, тому активність цих

ферментів свідчить про тяжкість пошкодження клітин печінки. Саме активність АлТ і АсТ традиційно використовують як чутливі маркери для визначення ступеня ураження печінки [52].

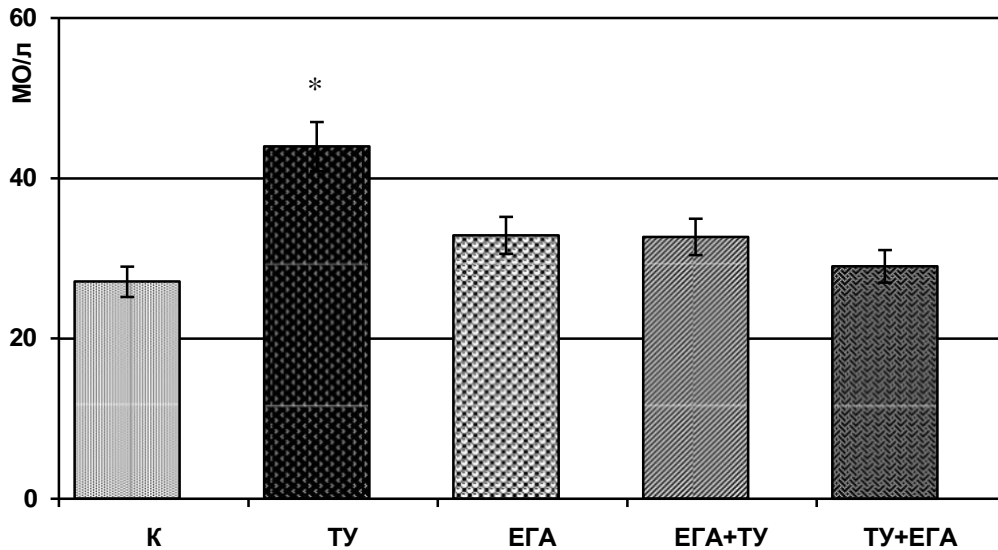


Рис. 3.2. Аспартатамінотрансферазна активність у сироватці крові щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

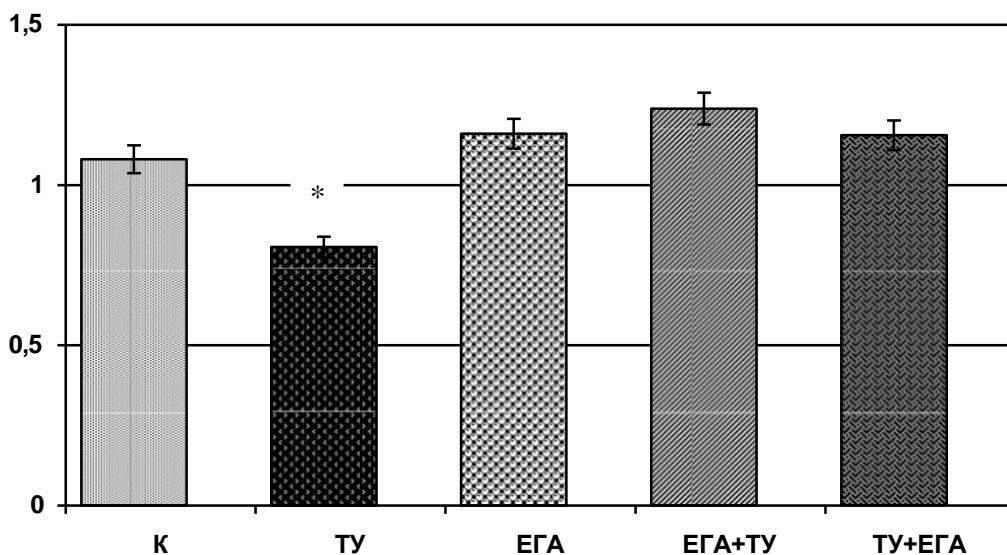


Рис. 3.3. Коефіцієнт де Рітиса у щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

Показано, що при передозуванні парацетамол перетворюється на високотоксичний проміжний N-ацетил-*n*-бензохінонімін (NAPQI), який може

швидко виснажити 90% глутатіону (GSH) у клітинах та мітохондріях, що зрештою призводить до мітохондріальної дисфункції та загибелі гепатоцитів. Окрім того, NAPQI може ковалентно зв'язуватися з ліпідами клітинних мембран, що викликає різке збільшення ліпідних пероксидів з подальшим підвищенням деяких печінкових маркерних ферментів, зокрема АсТ та АлТ, оскільки клітинні мембрани особливо чутливі до пероксидного окислення, індукованого вільними радикалами.

Також нами встановлено, що введення парацетамолу у дозі 1250 мг/кг призводить до підвищення активностей ензиматичних маркерів холестазу, зокрема лужної фосфатази і гамма-глутамілтрансферази. ЛФ каталізує реакцію гідролізу різних етерів монофосфату при високому оптимальному рН з вивільненням неорганічного фосфату. ГГТ в основному розташований у епітеліальних клітинах жовчовивідних епітелію та апікальній мембрані гепатоцитів у печінці [53]. Підвищення активності ЛФ (рис. 3.4) і ГГТ (рис. 3.5) порівняно з контролем може свідчити про печінкову недостатність або закупорку жовчевих проток [54].

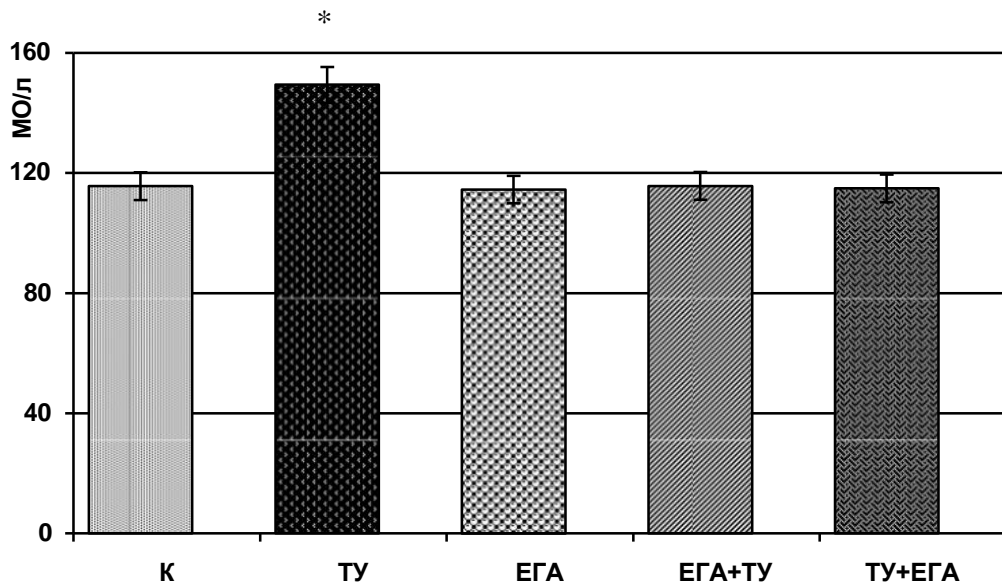


Рис. 3.4. Активність лужної фосфатази у сироватці крові щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба

Hericium alpestre

Окрім того, у тварин досліджуваної групи спостерігається підвищення вмісту як загального (рис. 3.6), так і прямого білірубину (рис. 3.7).

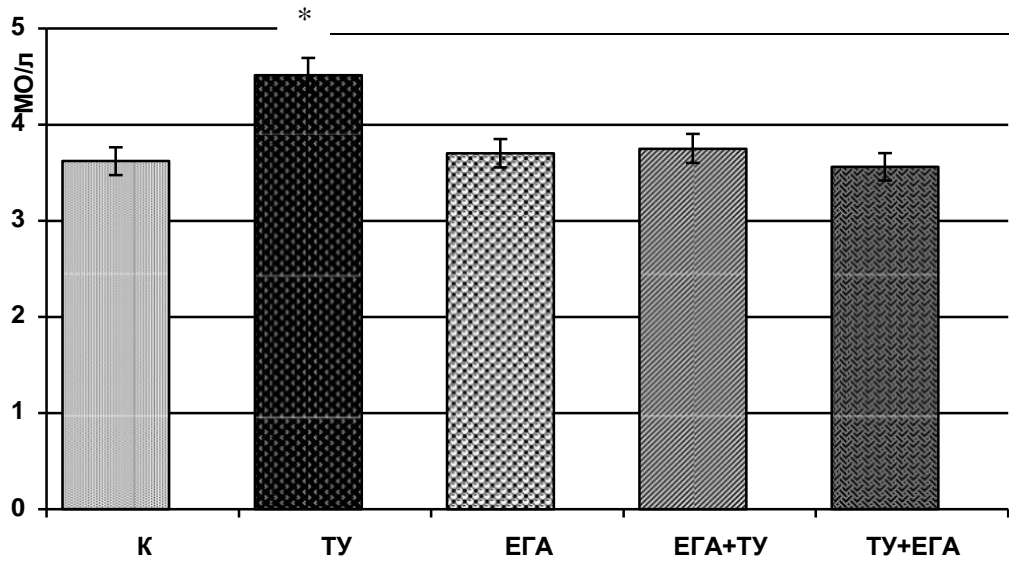


Рис. 3.5. Активність ГГТ у сироватці крові щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

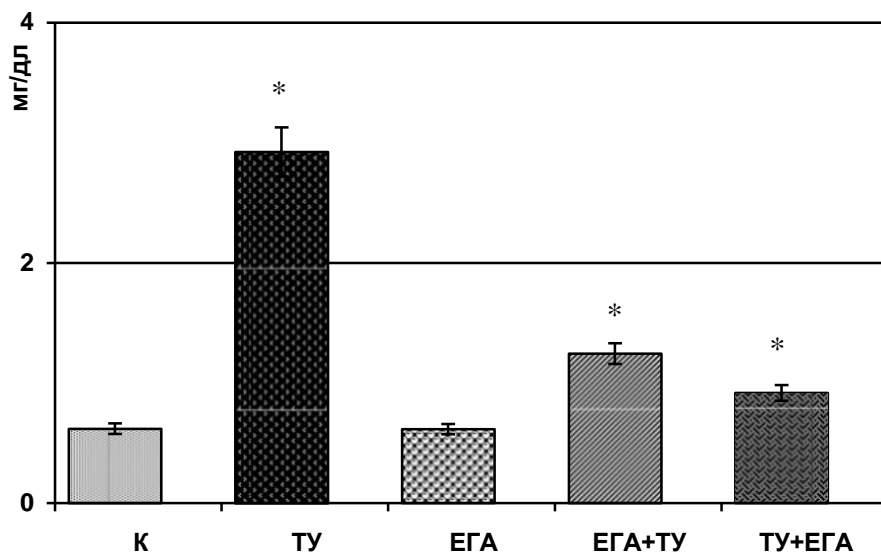


Рис. 3.6. Вміст загального білірубину у сироватці крові щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

Загальний білірубін у сироватці розглядається як один із надійних тестів для оцінки функції печінки, а також відображає здатність печінки метаболізувати білірубін [55]. Високий рівень загального білірубину у щурів,

які отримали токсичні дози ацетамінофену, може бути пов'язаний з токсичністю препарату.

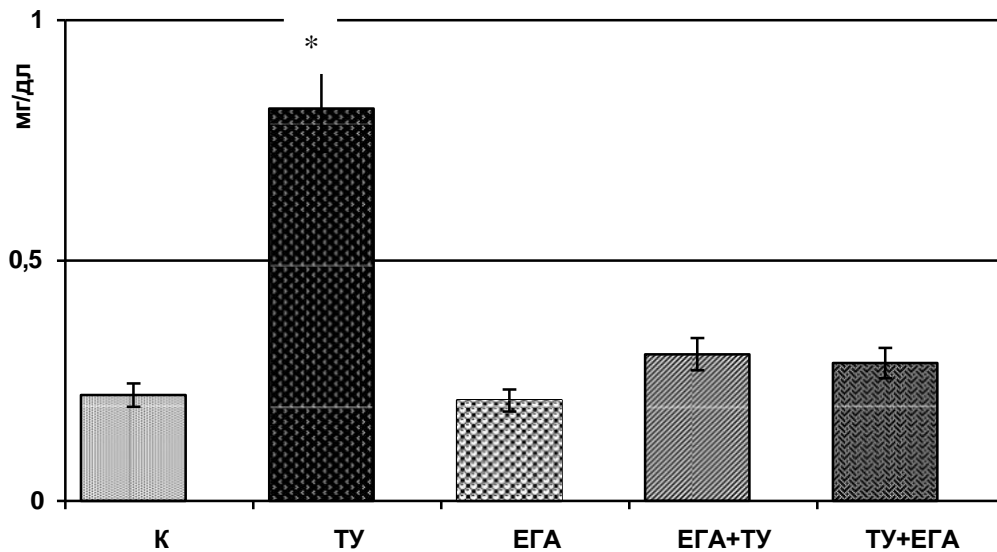


Рис. 3.7. Вміст прямого білірубину у сироватці крові щурів за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

“Аналіз гістологічного зрізу печінки показав, що для тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном характерні виражені зміни морфології печінки, зокрема виявлено оборотне набухання клітин печінки (гідропічна вакуолізація охоплює до 74 % клітин печінки), більше виражене по периферії печінкових часточок; спостерігаються ознаки гідропічної дегенерації і некрозу, виявляються клітини з ознаками запалення (рис. 3.8)” [6]. Такі гістологічні зміни вказують на накопичення води у гепатоцитах, причиною чого може бути порушення функціонування іонних насосів плазматичних мембран. Для окремих гепатоцитів характерна зерниста дистрофія, причиною чого може бути порушення метаболізму і накопичення денатурованих білків.

Отже, аналіз гістологічних зрізів та показане нами підвищення активності АлТ, АсТ, ЛФ, ГГТ і білірубину, які належать до ранніх маркерів ушкодження печінки, свідчить, що за умов введення парацетамолу у дозі 1250 мг/кг виникає токсичне ураження печінки, зокрема гепатоцелюлярний тип пошкодження гепатоцитів.

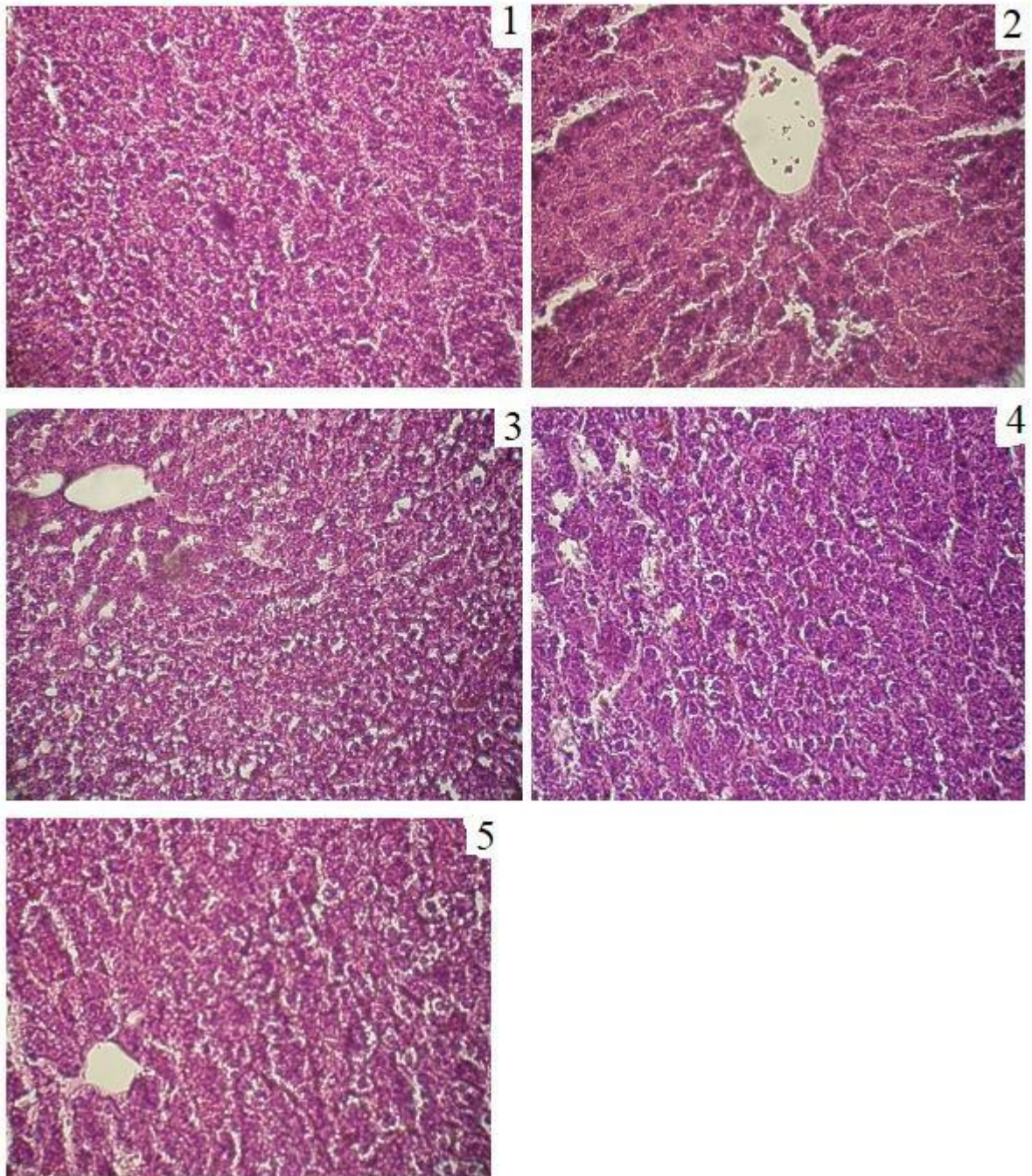


Рис. 3.8. Мікрофотографії гістологічного зрізу печінки (збарвлення гематоксиліном і еозином, 100×)

*1 – контрольні тварини; 2 – тварини, яким моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном; 3 – щури, яким вводили per os 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла протягом 10 діб; 4– тварини, яким перед моделюванням гострого ацетамінофен-індукованого токсичного ураження протягом 10 діб*

*вводили per os 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла; 5 – тварини, яким перед моделюванням гострого ацетамінофен-індукованого токсичного ураження протягом 10 діб вводили per os 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 500 мкг/кг маси тіла.*

“Гриби на сьогодні розглядаються як потенційне джерело біологічно активних сполук, що можуть використовуватися у медичній практиці для корекції різноманітних порушень або розглядатися як кандидати для створення нових шаблонів синтетичних ліків. Понад 25 % ліків мають природне походження або містять компоненти природного походження. Тому залишається актуальним питання пошуку природних джерел біоактивних сполук як альтернативи неселективним, токсичнішим та менш чутливішим синтетичним лікам” [6]. Згідно з дослідженнями, проведеними за останні п’ять років, екстракти деяких рослин та грибів зменшують прояви запалення, окислювального стресу, гальмують апоптоз та пошкодження мітохондрій. Ці механізми можуть певною мірою запобігти або корегувати ушкодження клітин, індуковані парацетамолом. Єдиний терапевтичний препарат, затверджений для лікування ушкодження печінки, спричиненого АРАР – ацетилцистеїн. Своєчасне введення ацетилцистеїну пацієнтам з інтоксикацією ацетамінофеном має вирішальне значення для зменшення її проявів. Проведені дослідження свідчать, що в основі гепатопротекторної дії різних екстрактів можуть лежати різні механізми. Зокрема, екстракти рослин чи грибів здатні посилювати антиоксидантний захист, інгібувати активність ферментів цитохрому Р450, стабілізувати клітинні мембрани та захищати гепатоцити, сприяючи регенерації печінки, зменшуючи вміст прозапальних цитокінів, сповільнювати апоптоз. Переважно гепатопротекторні ефекти екстрактів пояснюють їх антиоксидантною та мембранностабілізуючою дією [56]. Так, дубильні речовини, алкалоїди, флавоноїди та поліфеноли, які містяться у природніх екстрактах, покращують функцію печінки, пошкоджену парацетамолом [57]. Антиоксидантні сполуки можуть зменшити вміст вільних

радикалів, що утворюються при метаболізмі парацетамолу, та запобігати ураженням печінки.

Для вивчення гепатопротекторних властивостей екстрактів грибів використовують два підходи: один передбачає введення екстракту з профілактичною метою, тобто до моделювання токсичного ураження, а інший – терапевтичний, або коригуючий, що передбачає введення екстракту після моделювання. Перший підхід дозволяє оцінити здатність екстракту запобігати розвитку uszkodження печінки або зменшувати його тяжкість, а другий – оцінити здатність екстракту сприяти відновленню або лікуванню уже наявного ураження.

У нашому дослідженні ми вивчали ефект введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* тваринам до і після моделювання токсичного ураження печінки ацетамінофеном. Цей гриб належить до маловивчених грибів роду *Hericium*. Показано, що біологічно активні сполуки гриба *Hericium alpestre* здатні виявляти протипухлинну дію [58], а також нейротрофні ефекти [59]. Гепатопротекторні властивості екстрактів цього гриба не досліджувалися.

Наші дослідження показали, що введення 20% етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* щурам перед моделюванням токсичного ураження печінки виявляє захисні ефекти. Так, активність досліджуваних ензиматичних маркерів печінки АлТ, АсТ, ЛФ, ГГТ (рис. 3.1. – рис. 3.3, рис. 3.5) за умов введення досліджуваного екстракту достовірно знижується, а коефіцієнт де Рітиса – підвищується і наближається до рівня контрольних значень (рис. 3.4). Водночас спостерігається зниження вмісту загального і прямого білірубіну, проте вміст загального білірубіну залишається вищим за контрольні значення (рис. 3.6. – 3.7.). Аналіз гістологічного зрізу показав, що у тканині печінки тварин цієї групи є лише незначні ознаки гідропічної дистрофії: гепатоцити та їх ядра дещо збільшені в розмірах, проте інших проявів ураження не спостерігається порівняно з тваринами з токсичним ураженням ацетамінофеном, які не отримували екстракт досліджуваного гриба (рис.

3.8). У роботі [60] вивчався захисний ефект екстракту гриба *Hericium erinaceus* у дозі 200 мг/кг, який вводили мишам з алкогольним ураженням печінки, і було показано, що екстракт зменшував активність АлТ і АсТ у сироватці крові, а також зменшував прояви оксидативного стресу у печінці.

Отже, відновлення ензиматичних і неензиматичних маркерів стану печінки до рівня контрольних значень у тварин, які перед моделюванням ацетамінофен-індукованого ураження печінки протягом 10 діб отримували етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre*, підтверджує його гепатопротекторні властивості.

У науковій літературі відсутня інформація щодо гепатопротекторних властивостей гриба *Hericium alpestre*. У більшості досліджень вивчався гриб *Hericium erinaceus*. Водночас показано, що всі гриби цього роду збагачені на такі біологічно активні сполуки як полісахариди, резорциноли, ериценаони, гериценаони, моно- і дитерпени, які виявляють антиоксидантні, протизапальні та імуномодулюючі властивості. Антиоксидантні властивості гриба *Hericium erinaceus* дослідники пов'язують зі здатністю його екстрактів зменшувати прояви оксидативного стресу шляхом підвищення активності антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази) та зниження вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів, зокрема МДА; проявляти протизапальну дію шляхом зменшення вмісту прозапальних цитокінів.

Введення екстракту гриба *Hericium alpestre* з терапевтичною метою показало, що за досліджуваних умов також спостерігається відновлення показників структурно-функціонального стану печінки до значень контролю (рис. 3.1. – рис. 3.8). Отже, етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre* може зменшувати прояви гострого токсичного ураження ацетамінофеном незалежно від способу його введення – до чи після введення токсичних доз препарату.

Отримані результати показали, що гриб *Hericium alpestre* може розглядатися як цінне джерело біологічно активних сполук з гепатопротекторною активністю, має значний потенціал для розробки на його основі гепатопротекторних препаратів та є перспективним кандидатом для розробки нових профілактичних та лікувальних стратегій.

Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre* зменшує прояви ацетамінофен-індукованої гепатотоксичності, проте потребує подальшого вивчення компонентний склад та механізми гепатопротекторної дії біологічно активних сполук екстракту досліджуваного гриба з метою профілактики та корекції токсичних уражень печінки, спричинених ацетамінофеном. Окрім того, подальшого вивчення потребують фармакокінетичні та фармакодинамічні ефекти сполук гриба *Hericium alpestre* у цій моделі.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що для тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном характерні виражені зміни морфології печінки, зокрема виявлено ознаки гідропічної дегенерації і некрозу гепатоцитів, виявляються клітини з ознаками запалення. Гістологічні зміни вказують на накопичення води у гепатоцитах, причиною чого може бути порушення функціонування іонних насосів плазматичних мембран. Для окремих гепатоцитів характерна зерниста дистрофія, причиною чого може бути порушення метаболізму і накопичення денатурованих білків.

2. Показано підвищення активності АлТ, АсТ, ЛФ, ГГТ, вмісту загального і прямого білірубину, які належать до маркерів ушкодження печінки, що вказує на виникнення токсичного ураження печінки, зокрема гепатоцелюлярний тип пошкодження гепатоцитів, за умов введення парацетамолу у дозі 1250 мг/кг.

3. Встановлено, що введення 20% етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* щурам перед та після моделювання токсичного ураження печінки виявляє захисні ефекти, зокрема активність АлТ, АсТ, ЛФ, ГГТ достовірно знижується, а коефіцієнт де Рітиса – підвищується і наближається до рівня контрольних значень. Водночас спостерігається виражене зниження вмісту загального і прямого білірубину, проте вміст загального білірубину залишається вищим за норму. Аналіз гістологічного зрізу показав зменшення проявів ушкодження гепатоцитів, оскільки у тканині печінки тварин за умов введення екстракту досліджуваного гриба виявляються лише незначні ознаки гідропічної дистрофії.

Отримані результати показали, що гриб *Hericium alpestre* може розглядатися як цінне джерело біологічно активних сполук з гепатопротекторною активністю, має значний потенціал для розробки на його основі гепатопротекторних препаратів та є перспективним кандидатом для розробки нових профілактичних та лікувальних стратегій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Asrani S.K., Devarbhavi H., Eaton J., Kamath P.S. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol.* 2019. Vol. 70, № 1. P. 151-171.
2. Ezhilarasan D., Karthikeyan S., Najimi M., Vijayalakshmi P., Bhavani G., Jansi Rani M. Preclinical liver toxicity models: Advantages, limitations and recommendations. *Toxicology.* 2025. Vol. 511. P. 154020.
3. Saleem M., Iftikhar H. A Rare Case of Acetaminophen Toxicity Leading to Severe Kidney Injury. *Cureus.* 2019. Vol. 11(6). P. e5003.
4. Sasidharan S., Aravindran S., Latha L.Y., Vijenthil R., Saravanan D., Amutha S. *In vitro* Antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Lentinula edodes* against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Molecules.* 2010. Vol. 15. P. 4478-4489.
5. Волощук О.М., Шнайдер І.С. Ензиматичні маркери стану печінки за умов введення етанольного екстракту гриба *Herichium alpestre* тваринам з інтоксикацією ацетамінофеном. *Біологічні системи.* 2025. Т. 17. вип. 1. С. 3–8.
6. Soares A.A., de Sá-Nakanishi A.B., Bracht A., da Costa S.M., Koehnlein E.A., de Souza C.G., Peralta R.M. Hepatoprotective effects of mushrooms. *Molecules.* 2013. Vol. 18(7). P. 7609-30.
7. Qi W., Zhao T., Liu M., Shi X., Yang Y., Huang Y., Li N., Ai K., Huang Q. Engineered tantalum sulfide nanosheets for effective acute liver injury treatment by regulating oxidative stress and inflammation. *J Colloid Interface Sci.* 2025. Vol. 693. P. 137596.
8. Binu M., Samkutty R.T., Caliendo T. Understanding drug-induced liver injury. *US Pharm.* 2023. Vol. 48 (12). P. 8-12.
9. Hu J., Ramshesh 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. *Toxicol Sci.* 2016. Vol. 150. P. 204-215.

10. Qiu X., Zhang Y., Liu T., Shen H., Xiao Y., Bourner M.J., Pratt J.R., Thompson D.C., Marathe P., Humphreys W.G., Lai Y. Disruption of BSEP function in HepaRG cells alters bile acid disposition and is a susceptible factor to drug-induced cholestatic injury. *Mol Pharm.* 2016. Vol. 13. P. 1206-1216.
11. Jaeschke H., Adelusi O.B., Akakpo J.Y., Nguyen N.T., Sanchez- Guerrero G., Umbaugh D.S., Ding W.X., Ramachandran A. Recommendations for the use of the acetaminophen hepatotoxicity model for mechanistic studies and how to avoid common pitfalls. *Acta Pharm Sin B.* 2021. Vol. 11. P. 3740-3755.
12. Hu J., Lemasters J.J. Suppression of iron mobilization from lysosomes to mitochondria attenuates liver injury after acetaminophen overdose in vivo in mice: protection by minocycline. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2020. Vol. 392. P. 114930.
13. Umbaugh D.S., Nguyen N.T., Jaeschke H., Ramachandran A. Mitochondrial membrane potential drives early change in mitochondrial morphology after acetaminophen exposure. *Toxicol Sci.* 2021. Vol. 180. P. 186-95.
14. Adams L., Franco M.C., Estevez A.G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med.* 2015. Vol. 240. P. 711-717.
15. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007. Vol. 87. P. 315-424.
16. Schroder K., Zhou R., Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science.* 2010. Vol. 327. P. 296-300.
17. Yang T., Wang H., Wang X., Li J., Jiang L. The dual role of innate immune response in acetaminophen-induced liver injury. *Biology.* 2022. Vol. 11. P. 1057.
18. Zhao J.W., Zhao W.Y., Zhao M., Yu L. Functional foods and bioactive compounds: a comprehensive review on their role in mitigating drug-induced liver injury. *Front Nutr.* 2025. Vol. 11. P. 1499697.
19. Grattagliano I., Ubaldi E., Portincasa P., Palasciano G. Liver disease: Early signs you may be missing. *J. Fam. Practice.* 2009. Vol. 58. P. 514-521.
20. Sharma S.K., Mohan A. Miliary tuberculosis. *Microbiol Spectr.* 2017. Vol. 5 (2). P. 10.

21. Shaoqiang W., Qiaohua Y., Huai L., Yongzhong L. The feasibility of using liver function indices and FibroScan in combination to predict the occurrence of anti-tuberculosis drug-induced liver injury in Patients with liver disease. *J Med Biochem.* 2025. Vol. 44 (1). P. 17-23.
22. Oh R.C., Husted T.R., Ali S.M., Pantsari M.W. Mildly Elevated Liver Transaminase Levels: Causes and Evaluation. *Am Fam Physician.* 2017. Vol. 96 (11). P. 709-715.
23. Ruhl C.E., Everhart J.E. Trunk fat is associated with increased serum levels of alanine aminotransferase in the United States. *Gastroenterology.* 2010. Vol. 138 (4). P. 1346-56.
24. Bessone F., Dirchwolf M., Rodil M.A., Razori M.V., Roma M.G. The severity of DILI according to baseline liver disease: is chronic liver disease a risk factor for severe DILI? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2022. Vol. 18. P. 223-233.
25. Xu J., Shi X., Pan Y. The association of aspartate aminotransferase/alanine aminotransferase ratio with diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2021. Vol. 14. P. 3831- 3837.
26. Xu Z., Xu B. Nonlinear association between AST/ALT ratio and 28-day all-cause mortality following ICU admission in critically ill cirrhotic patients: a retrospective cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2025. Vol. 25 (1). P. 367.
27. Lala V., Zubair M., Minter D.A. Liver Function Tests. 2023 In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
28. Sookoian S., Pirola C.J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. *World J Gastroenterol.* 2015. Vol. 21 (3). P. 711-725.
29. Kechagias S., Ernersson A., Dahlqvist O., Lundberg P., Lindström T., Nystrom F.H. Fast-food-based hyper-alimentation can induce rapid and profound elevation of serum alanine aminotransferase in healthy subjects. *Gut.* 2008. Vol. 57. P. 649-654.

30. Gowda S., Desai P.B., Hull V.V., Math A.A., Vernekar S.N., Kulkarni S.S. A review on laboratory liver function tests. *Pan Afr Med J.* 2009. Vol. 3. P. 17.
31. Xu Z., Xu B. Nonlinear association between AST/ALT ratio and 28-day all-cause mortality following ICU admission in critically ill cirrhotic patients: a retrospective cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2025. Vol. 25 (1). P. 367.
32. Pavuluri P., Menon M.G., Tummalacharla S.C., Sameer Raheem S., Karpay S., Chepuri P. Liver Enzymes and Inflammatory Markers Among Severely Ill COVID-19 Patients: A Retrospective Case-Control Study in Telangana. *Cureus.* 2024. Vol. 16 (12). P. e75120.
33. Sharma U., Pal D., Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem.* 2014. Vol. 29 (3). P. 269-278.
34. Buchet R., Millán J.L., Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Methods Mol Biol.* 2013. Vol. 1053. P. 27-51.
35. Koenig G., Seneff S. Gamma-Glutamyltransferase: A Predictive Biomarker of Cellular Antioxidant Inadequacy and Disease Risk. *Dis Markers.* 2015. Vol. 2015. P. 818570.
36. Gowda S., Desai P.B., Hull V.V., Math A.A., Vernekar S.N., Kulkarni S.S. A review on laboratory liver function tests. *Pan Afr Med J.* 2009. Vol. 22. P. 17.
37. Fevery J. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver Int.* 2008. Vol. 28 (5). P. 592-605.
38. Chang S.T.; Buswell J.A. Medicinal mushrooms – A prominent source of nutraceuticals for the 21st century. *Curr. Top. Nutr. Res.* 2003. Vol. 1. P. 257- 280.
39. Preeti A., Pushpa S., Sakshi S., Jyoti A. Antioxidant mushrooms: A review. *Int. Res. J. Pharm.* 2012. Vol. 3. P. 65-70.
40. Peralta R.M., Oliveira A.L., Eler G.J., Soares A.A., Bracht A. Funcional properties of edible and medicinal mushrooms. *Curr. Trends Microbiol.* 2008. Vol. 4. P. 45-60.

41. Lindequist U., Timo H.J.N., Julich W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2005. Vol. 2. P. 285-299.
42. Mroueh M., Saab Y., Rizkallah R. Hepatoprotective activity of *Centarium erythraea* on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Res.* 2004. Vol. 18. P. 431-433.
43. Zhao J.W., Zhao W.Y., Zhao M., Yu L. Functional foods and bioactive compounds: a comprehensive review on their role in mitigating drug-induced liver injury. *Front Nutr.* 2025. Vol. 11. P. 1499697.
44. Hu Q., Wang D., Yu J., Ma G., Pea F., Yang W. Neuroprotective effects of six components from *Flammulina velutipes* on H₂O₂-induced oxidative damage in PC12 cells. *J Func Foods.* 2017. Vol. 37. P. 586-593.
45. Xia Y., Wang D., Li J., Chen M., Wang D., Jiang Z., Liu B. Compounds purified from edible fungi fight against chronic inflammation through oxidative stress regulation. *Front. Pharmacol.* 2022. Vol. 13. P. 974794.
46. Волощук О.М. Особливості імунореактивності у щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі протеїнової недостатності. *Біологічні системи.* 2024. Т. 16, вип. 1. С. 24–30.
47. Boonsong S., Klaypradit W., Wilaipun P. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources.* 2016. Vol. 50 (2). P. 89–97.
48. Herasymiuk I.Y., Korytskyy A.H. Character and features of morphofunctional reactions of renal vessels in rats at chronic poisoning with acetylsalicylic acid. *Reports of Morphology.* 2018. Vol. 24 (2). P. 27–32.
49. Li X., Lao R., Lei J., Chen Y., Zhou Q., Wang T., Tong Y. Natural products for acetaminophen-induced acute liver injury. *Molecules.* 2023. Vol. 28 (23). P. 7901.
50. Moreno-Torres M., Quintás G., Castell J.V. The potential role of metabolomics in drug-induced liver injury (DILI) assessment. *Metabolites.* 2022. Vol. 12 (6). P. 564.

51. Larrey D. Drug-induced liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2000. Vol. 32 (1). P. 77–88.
52. McGill M.R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI Journal*. 2016. Vol. 15. P. 817–828.
53. Sinaga E., Fitrayadi A., Asrori A., Rahayu S.E., Suprihatin S., Prasasty V.D. Hepatoprotective effect of *Pandanus odoratissimus* seed extracts on paracetamol-induced rats. *Pharmaceutical Biology*. 2021. Vol. 59 (1). P. 31–39.
54. Jassas R.S., Naeem N., Sadiq A., Mehmood R., Alenazi N.A., Al-Rooqi M.M., Mughal E.U., Alsantali R.I., Ahmed S.A. Current status of N-, O-, S-heterocycles as potential alkaline phosphatase inhibitors. *RSC Advances*. 2023. Vol. 13 (24). P. 16413–16452.
55. Vouffo E.Y., Donfack F.M.R.J., Temdie. Hepatho-nephroprotective and antioxidant effect of stem bark of *Allanblackia gabonensis* aqueous extract against acetaminophen-induced liver and kidney disorders in rats. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2012. Vol. 2 (4). P. 337–344.
56. Li X., Lao R., Lei J., Chen Y., Zhou Q., Wang T., Tong Y. Natural products for acetaminophen-induced acute liver injury. *Molecules*. 2023. Vol. 28 (23). P. 7901.
57. Abirami A., Nagarani G., Siddhuraju P. Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol-induced liver injury in rats. *Food Science and Human Wellness*. 2015. Vol. 4 (1). P. 35–41.
58. Li L.N., Wang L., Guo X.L. Chemical constituents from the culture of the fungus *Hericium alpestre*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2019. Vol. 21 (8). P. 735–741.
59. Sum W.C., Ebada S.S., Kirchenwitz M., Kellner H., Ibrahim M.A.A., Stradal T.E.B., Matasyoh J.C., Stadler M. Hericioic acids A–G and hericiofuranoic acid: neurotrophic agents from cultures of the European mushroom *Hericium flagellum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2023. Vol. 71 (29). P. 11094–11103.

60. Hao L., Xie Y., Wu G., Cheng A., Liu X., Zheng R., Huo H., Zhang J. Protective effect of *Herichium erinaceus* on alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015. Vol. 2015. P. 418023.

ДОДАТКИ

Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

1. Кожен працівник лабораторії повинен мати робоче місце. В лабораторії робочим місцем є хімічний стіл, який повинен бути покритий кахельною плиткою або кислототривким пластиком.

2. Перед початком роботи слід одягти спецодяг, який зберігається в індивідуальних шафах, окремо від верхнього одягу.

3. В спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторних приміщень (адміністративні, побутові приміщення, тощо).

4. При роботі зі скляними приладами необхідно:

- захищати руки рушником при зборі скляних приладів або з'єднанні окремих частин їх за допомогою каучуку або гуми; при розламуванні скляних трубок притримувати лівою рукою трубку біля надпилу;

- при закриванні колби, пробірки або іншої тонкостінної посудини пробкою, тримати посудину за верхню частину шийки ближче до місця, куди вставляється пробка, захищаючи руку рушником;

- оплавляти і змочувати водою кінці трубок і паличок до одягання каучуку; при плавленні кінців трубок і паличок користуватися тримачами.

5. Скляні пробірки з розчином слід нагрівати поступово, безперервно обертаючи їх, час від часу струшуючи.

6. Нагріваючи посудину не можна закривати притертим корком поки вона не охолоне.

7. Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

8. При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

9. Великі хімічні склянки з рідиною піднімають тільки двома руками так, щоб відігнуті краї стакана спиралися на вказівні пальці.

10. Великі (більше 5 кг) сулії з рідиною необхідно переносити вдвох у спеціальних кошиках або ящиках з ручками.

11. При закупорюванні корками посудин із реактивами враховують їх властивості. Гумові корки сильно набухають під дією деяких реактивів (спирт, бензол, ацетон, ефір), а під дією галогенів (бром, йод) втрачають еластичність. Такі реактиви краще закупорювати скляними притертими корками. Луг не можна закупорювати притертою коркою, тому що карбонати, що утворюються між корком і горлом, заклинюють пробку.

12. При переливанні рідин (окрім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

13. При змішуванні (розведенні) речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

14. Нагрівання сильнодіючих отруйних речовин проводять тільки в круглодонних колбах і не на відкритому вогні.

15. При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- всю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;

- при приготуванні розчинів кислот, спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім обережно додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;

- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями. Щоб запобігти розігріванню розчину, при приготуванні розчинів лугів, посуд попередньо поміщають у водяну баню:

- розбивання великих шматків їдкого лугу на дрібні роблять користуючись захисними фартухом і рукавичками, у спеціально відведеному місці, при цьому розбиті шматки накривають бельтингом або іншим матеріалом;

- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації;

- бутлі з кислотами, лугами й іншими їдкими речовинами переносять удвох у спеціальних ящиках (кошиках) або перевозять на спеціальному візку попередньо перевіривши цілісність тари;

- при кип'ятінні кислотних і лужних розчинів не можна щільно закривати посуд пробкою до повного їх охолодження.

- при митті посуду хромовою сумішшю запобігають попаданню її на шкіру, одяг, взуття.

16. При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт і ін.) дотримуються таких вимог:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при включеній вентиляції, вимкнутих газових пальниках і нагрівальних електроприладах відкритого типу;

- нагрівання легкозаймистих речовин проводять у витяжній шафі на піщаній або водяній бані з закритим електронагрівом;

- зберігати легкозаймисті рідини необхідно у товстостінних склянках у місцях, віддалених від відкритого вогню, в ящиках викладених азбестом з надписом «Вогненебезпечні речовини».

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогненебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;

- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра;

- виливати в раковину залишки кислот, лугів, легкозаймистих та горючих речовин, викидати туди тверді речовини;

- зберігати в приміщенні лабораторії вогнебезпечні речовини масою більше 1 кг кожної і 3-4 кг загальною масою.

17. Категорично забороняється збереження в лабораторії несправних або розбитих апаратів із ртуттю, несправних газових приладів і систем.

18. З метою безпеки, забороняється працювати одному в приміщенні лабораторії, а також залишати без нагляду працюючі лабораторні пристрої, газові пальники та ввімкнуті електроприлади.

19. Приміщення лабораторії мають бути обладнані спеціальними контейнерами для збору сміття. Утилізація відходів повинна проводитися регулярно у відповідності із спеціальними вимогами.

Після закінчення роботи необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.