

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

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

**Вміст білкових фракцій плазми крові тварин за умов токсичного ура-
ження ацетамінофеном та впливу етанольного екстракту гриба
*Hericium alpestre***

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 групи
спеціальності 091 Біологія

Прокопенко Наталя Олександрівна

Керівник:

д.б.н., професор, Копильчук Г.П.

*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

У межах дипломного дослідження було проаналізовано зміни білкового складу плазми крові лабораторних тварин за умов експериментального ураження печінки, викликаного ацетамінофеном, а також здійснено оцінку гепатопротекторних властивостей етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.

Установлено, що ацетамінофен провокує розвиток оксидативного стресу та ушкодження печінкової тканини, що проявляється зниженням концентрації альбуміну та підвищенням вмісту глобулінів у сироватці крові. Застосування екстракту *H. alpestre* сприяє відновленню співвідношення білкових фракцій, що вказує на його біохімічну активність, спрямовану на зменшення токсичного впливу та підтримання функціональної активності печінки.

Отримані результати підтверджують доцільність подальшого вивчення природних грибних екстрактів як компонентів комплексної терапії при токсичних ураженнях печінки.

Зміст

Вступ	4
Розділ I. Огляд літератури.....	5
1.1. Загальний білок плазми крові: біохімічна суть, функціональне значення та клінічна цінність.....	5
1.2. Фізіолого-біохімічна характеристика білкових фракцій плазми крові.....	7
1.2.1. Характеристика альбумінів крові	7
1.2.2. Значення і функції глобулінів	8
1.3. Ацетамінофен: фармакологічні властивості.....	11
1.3.1. Механізми ураження печінки ацетамінофеном.....	11
1.3.2. Зміни білкового профілю крові при токсичному ураженні печінки	12
1.4. Експериментальне використання екстрактів <i>Hericium alpestre</i> у біохімічних дослідженнях (огляд попередніх досліджень).....	14
1.4.1. Антиоксидантна активність <i>Hericium alpestre</i>	14
1.4.2. Вплив на імунну систему та білковий обмін	15
1.4.3. Перспективи використання <i>Hericium alpestre</i>	16
Розділ II. Методи і дослідження	17
2.1. Матеріали досліджень	17
2.2. Методи досліджень	18
Розділ III. Результати та обговорення.....	23
Висновки	28
Список використаних джерел.....	29
Додатки	32

Вступ

Ацетамінофен (парацетамол) є одним із найпоширеніших засобів із знеболювальною та жарознижувальною дією. Проте перевищення його терапевтичної дози може спричиняти серйозне ушкодження печінки, що пов'язано з надмірним утворенням токсичного метаболіту — *N-ацетил-n-бензохіноніміну* (NAPQI). Цей метаболіт ініціює розвиток оксидативного стресу, призводить до зниження рівня глутатіону, порушує цілісність клітинних мембран та спричиняє некротичні зміни в гепатоцитах.

У зв'язку з цим зростає зацікавленість до вивчення природних сполук, які можуть мати потенційну гепатопротекторну дію. Зокрема, представники родини *Hericiaceae*, а саме *Hericium alpestre*, привертають увагу дослідників завдяки вмісту біологічно активних компонентів: фенольних сполук, полісахаридів, ерінацинів. Ці речовини характеризуються антиоксидантними, протизапальними та цитопротекторними властивостями, що дає підстави розглядати екстракти таких грибів як потенційні засоби для зменшення оксидативного стресу та підтримання структурної і функціональної цілісності клітин печінки.

Одним із важливих показників системної відповіді організму на токсичне навантаження є зміна білкового складу плазми крові, зокрема співвідношення альбуміну та фракцій глобулінів. Метод електрофорезу білків дає змогу оцінити особливості порушень білкового обміну, що є цінним критерієм при дослідженні гепатотоксичності та ефективності застосування коригуючих засобів.

Мета даного дослідження - встановлення змін у білковому спектрі плазми крові лабораторних тварин під впливом токсичного навантаження ацетамінофеном та оцінка можливостей етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* у нормалізації зазначених біохімічних показників.

Розділ I

Огляд літератури

1.1 Загальний білок плазми крові: біохімічна суть, функціональне значення та клінічна цінність.

Плазма крові — це рідкий компонент крові, що становить приблизно 55–60 % її загального об'єму. Вона містить розчинені у воді іони, органічні та неорганічні сполуки, зокрема білки (наприклад, альбуміни, глобуліни, фібриноген), вуглеводи, солі, гормони, цитокіни, вітаміни та інші біологічно активні речовини. Також у ній присутні продукти розпаду клітин (дисиміляції), які виводяться з організму через видільні системи. Плазма виконує важливу роль у транспорті речовин, підтриманні кислотно-лужного балансу, осмотичного тиску та імунного захисту. Під час циркуляції через капіляри вона постійно обмінюється речовинами з клітинами тканин, проте її хімічний склад залишається відносно стабільним завдяки складним механізмам гомеостазу [1, 2].

Загальний білок сироватки крові є одним із ключових показників біохімічного аналізу, широко застосовуваним у лабораторній діагностиці для оцінки стану білкового обміну та загального функціонального стану організму. Він відображає сумарну концентрацію всіх білкових фракцій, розчинених у плазмі крові (без урахування фібриногену), та є важливим індикатором багатьох фізіологічних і патологічних процесів [3].

Цей показник чутливо реагує на порушення білкового синтезу, його розпад або надмірну втрату білків, а також на функціональний стан життєво важливих органів, таких як печінка (місце синтезу більшості білків), нирки (через можливу втрату білка з сечею), імунна система та система кровообігу. Аналіз рівня загального білка часто використовується для моніторингу хронічних захворювань, оцінки харчового статусу, виявлення

білково-енергетичної недостатності або контролю динаміки запального процесу [4].

Рівень загального білка в сироватці крові є важливим клініко-лабораторним маркером, що відображає сукупність багатьох фізіологічних процесів в організмі. Він інтегрує інформацію про синтетичну активність печінки, бар'єрну функцію нирок і слизової оболонки кишечника, стан імунної системи, наявність і ступінь вираженості запального процесу, а також загальний білково-енергетичний статус. Завдяки цьому, оцінка загального білка є невід'ємною частиною розширеного біохімічного обстеження пацієнтів із широким колом захворювань [4].

Особливо інформативним цей показник є у випадках хронічних патологій печінки, онкологічних процесів, затяжних інфекційних захворювань, аутоімунних і ревматичних станів, а також трофологічних порушень. У таких випадках загальний білок може служити індикатором тяжкості стану, темпів відновлення і ефективності терапевтичних заходів.

Таким чином, визначення рівня загального білка не лише допомагає оцінити поточний фізіологічний баланс організму, але й дозволяє виявити ранні ознаки патологічних змін, ще до появи виражених клінічних симптомів. Його регулярний контроль має велике значення для динамічного спостереження, оцінки відповіді на лікування та формування прогнозу у пацієнтів з різними захворюваннями [5, 6].

У структурі загального білка виділяють дві основні фракції: альбуміни (приблизно 60%) і глобуліни (близько 40%) [7].

Альбуміни — це низькомолекулярні білки, які синтезуються переважно в гепатоцитах. Вони виконують критично важливі функції: підтримують онкотичний (колоїдно-осмотичний) тиск плазми, забезпечують транспорт водонерозчинних сполук — таких як білірубін, жирні кислоти, гормони, іони металів і медикаменти, — а також відіграють роль у регуляції водного балансу [7].

Глобуліни — це гетерогенна група білків, які поділяються на альфа-, бета- та гамма-глобуліни. До їх складу входять білки гострої фази (наприклад, церулоплазмін, трансферин, ферритин), ферменти, імуноглобуліни (антитіла), а також транспортні й захисні білки. Саме глобуліни відповідають за імунологічний захист і регуляцію запальних процесів [7].

1.2 Фізіолого-біохімічна характеристика білкових фракцій плазми крові.

1.2.1. Характеристика альбумінів крові.

Альбумін є основним білком плазми крові, який виконує важливі функції для підтримки гомеостазу організму. Він складає приблизно 55–65% від загальної кількості білків плазми. Молекулярна маса альбуміну становить близько 66,5 кДа. Альбумін добре розчиняється у воді та слабких сольових розчинах, що сприяє його ефективному циркулюванню в крові. Він синтезується виключно в печінці з амінокислот, отриманих з їжі, і щодня виробляється в кількості близько 12 грамів. Тривалість життя альбуміну в крові складає близько 19–20 днів [8].

Серед основних функцій альбуміну можна виділити підтримання онкотичного тиску плазми, що допомагає утримувати воду в судинному руслі та запобігає її виходу в міжклітинний простір, тим самим знижуючи ризик розвитку набряків. Окрім того, альбумін виконує транспортну функцію, зв'язуючи та транспортуючи різноманітні речовини, зокрема жирні кислоти, стероїдні гормони, білірубін, метали (наприклад, кальцій та магній) і лікарські препарати, що забезпечує їх рівномірний розподіл по організму та доставку до відповідних тканин і органів. Альбумін також бере участь у підтриманні кислотно-лужного балансу крові, діючи як буфер, що нейтралізує надлишок кислот або лугів. У разі недостатнього надходження білків з їжею альбумін може розщеплюватися, забезпечуючи організм необхідними амінокислотами для синтезу інших білків [8, 9].

Клінічне значення рівня альбуміну в крові є важливим для оцінки стану здоров'я. Знижений рівень альбуміну, або гіпоальбумінемія, може вказувати на захворювання печінки, такі як цироз або гепатит, захворювання нирок, наприклад нефротичний синдром, недостатнє харчування чи мальабсорбцію, а також хронічні запальні процеси. Симптоми гіпоальбумінемії можуть включати набряки, загальну слабкість та зниження артеріального тиску [9].

З іншого боку, підвищений рівень альбуміну, або гіперальбумінемія, зустрічається рідко і зазвичай пов'язаний із дегідратацією або надмірним введенням альбуміну ззовні. Тому рівень альбуміну є важливим показником здоров'я, його зміни можуть допомогти в діагностиці та лікуванні різноманітних захворювань, а сам альбумін виконує критично важливі функції в організмі [9].

1.2.2. Значення і функції глобулінів.

Глобуліни — це високомолекулярні білки, які складають близько 35–40% від загальної кількості білків плазми крові. Вони добре розчиняються у розведених розчинах солей, але слабо розчинні у воді. Концентрація глобулінів у крові варіюється від 2 до 3,5 г/дл. Ці білки поділяються на кілька підгруп, залежно від їх електрофоретичної рухливості та функціональних особливостей [10].

Глобуліни можна класифікувати на чотири основні фракції:

Альфа-1-глобуліни. Це найменша за кількістю, проте функціонально надзвичайно важлива підгрупа глобулінів. Вони переважно синтезуються гепатоцитами і належать до білків гострої фази, що беруть активну участь у швидкій реакції організму на запалення, інфекції, травми та інші стресові чинники [10, 11].

Основним представником цієї фракції є альфа-1-антитрипсин — головний інгібітор серинових протеаз, який захищає тканини, зокрема леге-

неву паренхіму, від руйнівного впливу ферментів, що вивільняються при запаленні. Його дефіцит пов'язаний із розвитком емфіземи легенів і хронічного обструктивного захворювання [11].

Іншим важливим компонентом є орозомукоїд (альфа-1-кислий глікопротеїн), що володіє імуносупресивними властивостями та регулює запальну відповідь. Також до альфа-1-глобулінів належить трансортин (транскортиновий білок), який транспортує кортикостероїди, беручи участь у гормональній регуляції стресу [4, 11].

Альфа-2-глобуліни. Ця фракція також належить до білків гострої фази та демонструє зростання концентрації у відповідь на різні патологічні процеси.

До ключових представників належать:

- Гаптоглобін — білок, який зв'язує вільний гемоглобін після руйнування еритроцитів (гемолізу), запобігаючи втраті заліза та розвитку оксидативного стресу й ушкодженню нирок.
- Церулоплазмін — фермент, що містить мідь, відповідає за транспортування міді, бере участь у метаболізмі заліза, реалізує антиоксидантний захист.
- Альфа-2-макроглобулін — масивний білок, що інгібує широкий спектр протеаз, а також може транспортувати різні молекули, включно з цитокінами й гормонами [4, 6].

Підвищення рівня альфа-2-глобулінів відзначається при гострих запаленнях, нефротичному синдромі, травмах, тоді як зниження характерне для тяжкої печінкової недостатності та гемолітичних станів [10].

Бета-глобуліни. Ці білки виконують переважно транспортну та імунну функції. До них належать:

- Трансферин — головний білок для транспорту заліза до тканин і кісткового мозку.

- Гемопексин — білок, що зв'язує вільний гем, запобігаючи його токсичному впливу на клітини.
- Бета-ліпопротеїни — відповідають за транспортування ліпідів, зокрема холестерину.
- Білки комплементу (С3, С4) — важливі учасники вродженого імунітету, що забезпечують активацію запальної реакції, опсонізацію та лізис мікроорганізмів [11, 12].

Підвищення концентрації бета-глобулінів зустрічається при хронічних запаленнях, аутоімунних захворюваннях, гіперліпідемії, тоді як зниження — при виснаженні білкового запасу або тяжких ураженнях печінки [12, 13].

Гамма-глобуліни. Це найімунологічно активніша фракція глобулінів, що складається переважно з імуноглобулінів (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD) — антитіл, які забезпечують гуморальний імунітет:

- IgG — основний клас антитіл, забезпечує довготривалий захист після інфекцій або вакцинації.
- IgA — діють на рівні слизових оболонок (респіраторна, шлунково-кишкова, сечостатева системи).
- IgM — першими синтезуються у відповідь на нову інфекцію.
- IgE — відповідальні за алергічні реакції негайного типу та захист від паразитів.
- IgD — регуляторна молекула на поверхні В-лімфоцитів, що бере участь у їх активації.

Рівень глобулінів у крові можна визначити за допомогою загального білкового тесту або електрофорезу сироваткових білків [12, 13].

1.3 Ацетамінофен: фармакологічні властивості.

Ацетамінофен (парацетамол) — це широко використовуваний анальгетик та антипіретик, ефективний для зниження болю та температури. Його дія пов'язана з пригніченням синтезу простагландинів у центральній нервовій системі та впливом на центр терморегуляції в гіпоталамусі. Після перорального прийому ацетамінофен швидко всмоктується зі шлунково-кишкового тракту, досягаючи максимальної концентрації в плазмі через 30–60 хвилин. Основний метаболізм відбувається в печінці шляхом глюкуронідації та сульфатації. Невелика частина препарату метаболізується за участю ферментів цитохрому P450 до реактивного проміжного продукту — N-ацетил-p-бензохінон-іміну (NAPQI), який у нормальних умовах інактивується глутатіоном [14, 16].

1.3.1. Механізми ураження печінки ацетамінофеном.

Токсичність ацетамінофену виникає переважно при передозуванні. Доза понад 150 мг/кг (близько 7,5 г для дорослої людини) протягом доби вважається потенційно токсичною. У нормальних умовах реактивний метаболіт NAPQI швидко знешкоджується за допомогою глутатіону — трипептиду, що відіграє ключову роль у підтриманні редокс-гомеостазу клітини. Глутатіон зв'язує NAPQI, перетворюючи його в нешкідливу сполучку, яка далі виводиться з організму. Але при передозуванні ацетамінофену запаси глутатіону в гепатоцитах стрімко виснажуються, що призводить до накопичення вільного NAPQI. У результаті цей токсичний метаболіт починає взаємодіяти з білками, ліпідами та нуклеїновими кислотами в клітинах печінки, насамперед у мітохондріях, порушуючи їхню функцію та спричиняючи окислювальний стрес [15, 16].

Пошкодження мітохондрій призводить до зниження вироблення АТФ — головного джерела енергії для клітини, що запускає каскад подій, пов'язаних з клітинною дисфункцією та загибеллю. Розвивається запальна

реакція, вивільняються медіатори запалення та активуються імунні клітини, що додатково посилює ураження гепатоцитів. Залежно від ступеня ушкодження, клітини можуть загинути або шляхом апоптозу — запрограмованої загибелі, або некрозу — неконтрольованого руйнування, що супроводжується вивільненням вмісту клітини та активацією запалення [17].

Накопичення масивного пошкодження печінкової тканини порушує ключові функції органу: детоксикацію, синтез білків (зокрема факторів згортання крові), підтримку глюкозного гомеостазу та регуляцію метаболізму. У тяжких випадках це може призвести до розвитку гострої печінкової недостатності, яка становить загрозу для життя [17].

Таким чином, хоча ацетамінофен є одним із найпоширеніших і безпечних препаратів при правильному використанні, його передозування може призвести до каскадного ушкодження клітин печінки, яке біохімічно обумовлене порушенням балансу між утворенням токсичних метаболітів і здатністю організму їх нейтралізувати. Раннє розпізнавання симптомів і своєчасне введення антидоту — N-ацетилцистеїну, який поповнює запаси глутатіону, — є критично важливим для зниження ризику летального ураження печінки [14,17].

1.3.2. Зміни білкового профілю крові при токсичному ураженні печінки.

Токсичне ураження печінки, зокрема внаслідок передозування ацетамінофену, супроводжується низкою характерних біохімічних змін у білковому та метаболічному профілі крові, що відображають ступінь порушення функцій печінки. Одним із ключових показників є зниження рівня альбуміну — основного білка плазми, який синтезується в гепатоцитах. Оскільки альбумін відповідає за підтримання онкотичного тиску та транспорт багатьох речовин (жирних кислот, білірубіну, ліків), його дефіцит

може спричинити розвиток гіпоонкотичних набряків і порушення метаболізму лікарських засобів [18].

Паралельно може спостерігатися підвищення рівня глобулінів, що часто відображає активізацію імунної системи у відповідь на пошкодження печінкової тканини та розвиток запалення. Така зміна співвідношення білкових фракцій — гіпоальбумінемія з компенсаторною гіперглобулінемією — є типовим проявом хронічного або масивного гострого ураження печінки [13, 18].

Особливо важливою є оцінка коагуляційного профілю, оскільки печінка синтезує більшість факторів згортання крові, зокрема протромбін. Коагулопатія в цьому контексті не лише свідчить про тяжкість ураження, а й є критичним прогностичним показником при гострій печінковій недостатності [18].

Показники активності печінкових трансаміназ — аланінамінотрансферази (ALT) та аспартатамінотрансферази (AST) — значно підвищуються при руйнуванні гепатоцитів. ALT є більш специфічною для печінки, тоді як AST також міститься в серці та м'язах, тому співвідношення AST/ALT може допомогти у диференціальній діагностиці [19].

Ще однією важливою ознакою є гіпераммоніємія — підвищення рівня аміаку в крові внаслідок порушення його утилізації через орнітиновий цикл, який відбувається в печінці. Надлишок аміаку є нейротоксичним і може призвести до печінкової енцефалопатії — небезпечного стану, що супроводжується змінами свідомості, когнітивними порушеннями й навіть комою [18, 19].

Таким чином, виявлені лабораторні зміни — гіпоальбумінемія, диспротеїнемія, порушення коагуляції, трансаміназемія та гіпераммоніємія — є важливими діагностичними та прогностичними маркерами печінкової токсичності. Вони дозволяють не лише оцінити тяжкість ураження, а й обрати адекватну терапевтичну стратегію, включно з призначенням гепато-

протекторів, детоксикуючих засобів та, за потреби, інтенсивною підтримкою життєвих функцій.

1.4 Експериментальне використання екстрактів *Hericium alpestre* у біохімічних дослідженнях (огляд попередніх досліджень).

1.4.1 Антиоксидантна активність *Hericium alpestre*.

Дослідження, проведене на кафедрі біохімії та біотехнології Чернівецького національного університету, продемонструвало значну антиоксидантну активність спиртових екстрактів плодових тіл гриба *Hericium alpestre*. Зокрема, при концентрації 0,25 мг/мл екстракт цього виду ефективніше поглинав вільні радикали DPPH, ніж екстракт *Hericium coralloides*, що свідчить про його потужні радикал-знешкоджувальні властивості. Крім цього, екстракти обох видів грибів продемонстрували виражену супероксид-інгібуючу та гідроксил-інгібуючу активність, інтенсивність якої прямо залежала від концентрації екстракту та досягала максимальних значень при 0,5 мг/мл [20].

Антиоксидантна дія цих екстрактів, імовірно, зумовлена наявністю в грибах біологічно активних сполук — таких як фенольні сполуки, флавоноїди, полісахариди та терпеноїди, які здатні ефективно нейтралізувати вільні радикали, знижувати рівень перекисного окиснення ліпідів і підтримувати активність ендогенних антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази). Такий механізм є особливо актуальним при оксидативному стресі — стані, що супроводжує багато патологічних процесів, включаючи медикаментозне токсичне ураження печінки [20, 21].

Отже, отримані дані підтверджують перспективність використання екстрактів *Hericium alpestre* як джерела природних антиоксидантів, які по-

тенційно можуть бути застосовані для профілактики та підтримувальної терапії при захворюваннях, пов'язаних з оксидативним стресом, зокрема при гепатотоксичних станах, спричинених передозуванням лікарських препаратів, таких як ацетамінофен.

1.4.2 Вплив на імунну систему та білковий обмін.

Вплив грибів роду *Hericium* на імунну систему та білковий обмін викликає зростаючий науковий інтерес, хоча специфічні дослідження щодо *Hericium alpestre* наразі обмежені. Найбільше експериментальних даних стосується *Hericium erinaceus*, і вони свідчать про його виражену імунomodуючу активність. Зокрема, полісахариди, виділені з *H. erinaceus*, здатні стимулювати імунні клітини до підвищеного синтезу оксиду азоту (NO), а також індукувати секрецію важливих прозапальних цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерлейкін-1 β (IL-1 β) та інтерлейкін-6 (IL-6). Ці молекули відіграють ключову роль у розвитку первинної імунної відповіді, зокрема при виявленні та знищенні патогенів, а також при активації інших імунокомпетентних клітин [22, 23].

Крім полісахаридів, білкові екстракти з *H. erinaceus* також виявляють позитивний вплив на імунну систему. В експериментальних моделях у мишей з індукованою імунною токсичністю було показано, що введення таких екстрактів сприяє активації Т-лімфоцитів, відновлює морфологічну структуру селезінки та підтримує нормальну архітекtonіку імунних органів, що свідчить про потенційне відновлення імунної гомеостазії [23].

Хоча ці результати стосуються переважно *H. erinaceus*, вони вказують на загальний біологічний потенціал грибів роду *Hericium* у модуляції імунної функції та підтримці білкового обміну. Полісахариди й білки грибів можуть виступати як біологічно активні молекули, що впливають на експресію імунних генів, регулюють запальні сигнальні шляхи і, можливо, беруть участь у процесах відновлення печінкової тканини та білкового си-

нтезу в умовах токсичного ураження. Враховуючи структурну й хімічну подібність між *H. alpestre* та *H. erinaceus*, можна припустити, що *H. alpestre* також володіє потенційною імуномодулюючою та метаболічною активністю, що потребує подальшого вивчення [23].

1.4.3 Перспективи використання *Hericium alpestre*.

Екстракти *Hericium alpestre* демонструють виражений антиоксидантний потенціал, що може відігравати важливу роль у захисті печінки від ушкоджень, спричинених оксидативним стресом. Завдяки здатності нейтралізувати вільні радикали, такі екстракти можуть зменшувати клітинне ураження, зумовлене токсичними метаболітами, зокрема в умовах гепатотоксичності. Хоча прямі дослідження, присвячені впливу *H. alpestre* на імунну систему та його ефективності при токсичних ураженнях печінки, наразі є обмеженими, дані щодо споріднених видів, особливо *Hericium erinaceus*, свідчать про їхню імуномодулюючу активність та здатність підтримувати білковий обмін. Це вказує на перспективність подальших досліджень *H. alpestre* як потенційного джерела біологічно активних речовин для профілактики і корекції печінкових патологій, зумовлених оксидативним та імунозалежним ушкодженням.

Розділ II

Методи досліджень

2.1. Матеріали досліджень.

Для експериментів використовували білих безпородних щурів із середньою масою тіла в межах 200–300 г. Усі процедури та маніпуляції, що здійснювалися з лабораторними тваринами, відповідали чинним нормам біоетичної практики, зокрема «Загальним етичним принципам експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та положенням Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних чи інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Згідно з установленими вимогами щодо умов утримання, тварини були розподілені за статтю і кількістю та розміщені в окремі пластикові клітки. Щурам забезпечувався вільний доступ до їжі й води протягом усього періоду дослідження. За загальним станом та поведінкою тварин проводилось щоденне спостереження, що дозволяло своєчасно виявляти можливі відхилення або реакції на втручання.

У дослідженні було задіяно 30 лабораторних щурів, яких попередньо розподілили на п'ять експериментальних груп:

I група (К) – контрольна, інтактні тварини, яким не вводили жодних препаратів.

II група (АРАР) – тварини, які протягом двох днів отримували токсичну дозу ацетамінофену. Препарат вводили перорально у вигляді суспензії на основі 2% крохмального гелю в дозуванні 1250 мг/кг маси тіла.

III група (Ех + АРАР) – щурам протягом 14 днів вводили етанольний екстракт гриба *Hericium alpester* у концентрації 200 мг/мл, а на 15–16 дні – ацетамінофен у токсичній дозі.

IV група (Ex) – щури, які щодня протягом 10 днів отримували етанольний екстракт *Hericium alpester* у концентрації 200 мг/мл, без додаткових впливів.

V група (ARAP + Ex) – протягом перших двох днів тварини отримували токсичну дозу ацетамінофену, після чого їм вводили етанольний екстракт *Hericium alpester* у концентрації 500 мг/мл протягом наступних семи днів.

Розтин тварин здійснювали під легким ефірним наркозом.

Приготування етанольного 70% екстракту гриба *Hericium alpester*.

Для приготування 70% (об./об.) етанольного екстракту до кожної порції порошкоподібного зразка гриба (5 г) додавали 50 мл 70% етанолу. Суміш ретельно перемішували та витримували при кімнатній температурі на шейкері зі швидкістю 150 об/хв протягом 24 годин. Після цього екстракт піддавали центрифугуванню при 12 000 об/хв упродовж 15 хвилин. Отриманий супернатант фільтрували крізь фільтрувальний папір Ватман, після чого фільтрат збирали. Залишок повторно екстрагували за аналогічних умов для підвищення виходу біологічно активних речовин.

Отримані екстракти об'єднували та концентрували під зниженим тиском за температури 40 °С з використанням роторного випарника Labfreez RE-2000E. Готовий концентрат зберігали у темному місці при температурі +4 °С до подальшого використання.

2.2. Методи досліджень.

Отримання сироватки крові.

Процес отримання сироватки крові складається з кількох послідовних етапів, кожен із яких вимагає дотримання чітких умов для забезпечення якості біологічного матеріалу та достовірності подальших аналізів.

1. Забір крові

Після забору венозної крові у щурів (зазвичай з хвостової вени або серця під наркозом), зразки одразу поміщали у стерильні пробірки без додавання антикоагулянтів, що дозволяє отримати сироватку. Важливо уникати стресових факторів або надмірного фізичного навантаження тварин перед забором, оскільки це може вплинути на біохімічні параметри крові.

2. Інкубація для зсідання крові

Після забору пробірки з кров'ю залишають у вертикальному положенні при кімнатній температурі (18–25 °C) на 20–30 хвилин, що дозволяє відбутися природному процесу згортання. У результаті формується згусток крові, що містить фібрин, тромбоцити та інші клітинні елементи.

3. Центрифугування

Після повного формування згустка крові пробірку піддають центрифугуванню для розділення фаз. Зазвичай цей процес проводиться при швидкості близько 3000 обертів за хвилину протягом 10–15 хвилин. У результаті центрифугування сироватка утворює прозорий верхній шар, тоді як згусток, що складається з формених елементів та фібрину, осідає на дно.

4. Відділення сироватки

Після завершення центрифугування сироватку обережно відбирають за допомогою стерильної піпетки або автоматичного дозатора, уникаючи порушення нижнього шару, який містить згусток. Сироватка повинна бути максимально прозорою та без домішок еритроцитів, що свідчить про відсутність гемолізу.

Визначення концентрації загального білка в сироватці крові.

Метод кількісного визначення білка базується на колориметричному аналізі за принципом реакції Біурета, вперше описаної у 1877 році. Раніше застосування іонів двовалентної міді у лужному середовищі було нестабі-

льним до появи стабілізаторів — зокрема, додавання тартрату калію-натрію, який виступає як комплексоутворювач. Сучасна версія методу, що використовується у клінічній практиці, ґрунтується на рекомендаціях Американської асоціації клінічної хімії (AACCC) та Національного комітету зі стандартів лабораторної діагностики (NCCLS).

Принцип методу. У лужному середовищі білки сироватки крові взаємодіють з іонами міді (Cu^{2+}), в результаті чого утворюється фіолетовий забарвлений комплекс. Інтенсивність цього забарвлення прямо пропорційна кількості білка в пробі.

Схематично:

Білок + Cu^{2+} → Забарвлений комплекс

Загальний білок виконує ключову роль у підтримці нормального розподілу рідини між кров'ю та тканинами завдяки регуляції осмотичного тиску. Зниження рівня білка зазвичай спричинене неправильним харчуванням, порушеннями синтезу білка, його надмірною втратою (наприклад, при кровотечах), або посиленням розпадом білкових структур. Підвищення концентрації білка найчастіше пов'язане з дегідратацією організму.

Дослід проводився на автоматичному біохімічному аналізаторі крові Biochem FC 120 з використанням спеціального набору реактивів.

Визначення співвідношень білкових фракцій сироватки крові.

Вміст білкових фракцій визначали за допомогою спеціально підготовленого набору реактивів, який призначений для визначення співвідношення білкових фракцій у сироватці крові людини.

Принцип методу визначення співвідношення білкових фракцій заснований на тому, що фосфатні розчини визначеної концентрації осаджують різні білкові фракції сироватки крові з утворенням дуже дрібної суспензії. За ступенем каламутності розчинів роблять висновок про співвідношення білків у дослідному матеріалі.

У штатив встановлюють сім пробірок об'ємом по 10 мл, які позначають цифрами: “0”, “1”, “2”, “3”, “4”, “5” та “6”. У пробірку “0” наливають 5 мл дистильованої води, а в пробірки з “1” по “5” додають по 5 мл відповідних фосфатних буферів (від №5 до №1).

У пробірку “6” вносять 3,75 мл розчину основного фосфатного буфера №0, додають 0,75 мл дистильованої води та ретельно перемішують. Потім додають 0,5 мл сироватки. Суміш перемішують шляхом обережного перевертання пробірки 5–6 разів, уникаючи утворення бульбашок повітря.

Далі з пробірки “6” відбирають по 0,5 мл суміші та переносять її до пробірок “0”, “1”, “2”, “3”, “4” та “5”. Перед кожним додаванням у нову пробірку суміш потрібно ще раз ретельно перемішати, оскільки це впливає на точність подальших вимірювань.

Через 15 хвилин після завершення підготовки, обережно перемішують вміст кожної пробірки. Потім вимірюють оптичну щільність отриманих розчинів (E1, E2, E3, E4 та E5 у пробірках “1”–“5”) відносно контрольного розчину з пробірки “0”.

Перед фотометричним вимірюванням пробірки потрібно ще раз обережно перемішати, не збовтуючи осад, а акуратно підіймаючи його з дна.

Фотометричні вимірювання здійснювалися за допомогою фотометричного обладнання, яке забезпечує визначення оптичної щільності розчинів при довжині хвилі 640 нм (у робочому діапазоні 620–700 нм). Прилад працює в межах оптичної щільності від 0 до 1,0 од. та використовує кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм. Застосування такого типу фотометричного обладнання дає змогу з високою точністю визначати концентрацію забарвлених речовин у розчинах, ґрунтуючись на принципі світлопоглинання. Вимірювання оптичної щільності при заданій довжині хвилі дозволяє отримати кількісні дані про вміст аналізованих сполук. Використання стабільної довжини хвилі є критично важливим для забезпечення точності та повторюваності результатів, особливо під час аналізу бі-

охімічних показників, таких як активність ферментів, концентрація білків чи вміст метаболітів.

Далі проводяться розрахунки та обчислення співвідношень кожної фракції у відносних, або абсолютних відсотках.

Розділ III

Результати та їх обговорення

Результати проведеного дослідження засвідчили, що токсичне ураження ацетамінофеном спричиняє певні порушення білкового обміну, які проявляються як у зміні загального рівня білка в плазмі крові, так і у дисбалансі окремих білкових фракцій. Зокрема, в групі тварин з токсичним ураженням (ТУ) відзначено підвищення концентрації загального білка порівняно з контрольною групою, що ймовірно зумовлене активацією синтезу білків гострої фази запалення та можливою дегідратацією, яка штучно концентрує білки плазми. Під впливом *Hericium alpestre* на фоні ТУ рівень білка знижувався, наближаючись до контрольних значень, що вказує на гепатопротекторну дію екстракту (рис. 3.1).

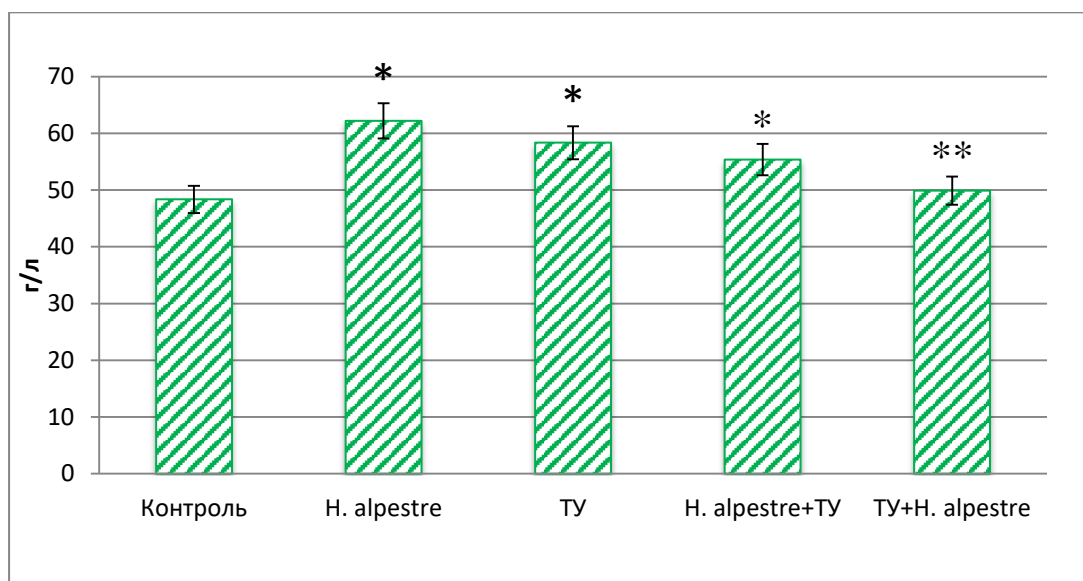


Рис. 3.1. Вміст загального білка у сироватці крові щурів

Токсичне ураження ацетамінофеном призвело до значного зниження вмісту альбумінів у сироватці крові (28%), порівняно з контрольною групою (34%). Це може свідчити про гепатотоксичну дію препарату та пригнічення білоксинтезуючої функції печінки. Уведення етанольного екстра-

кту гриба *Hericium alpestre* сприяло підвищенню концентрації альбумінів: до 36% у профілактичній схемі (ЕГА+ТУ) та до 42% — у лікувальній схемі (ТУ+ЕГА). Таким чином, екстракт продемонстрував виражений гепатопротекторний ефект (рис. 3.2).

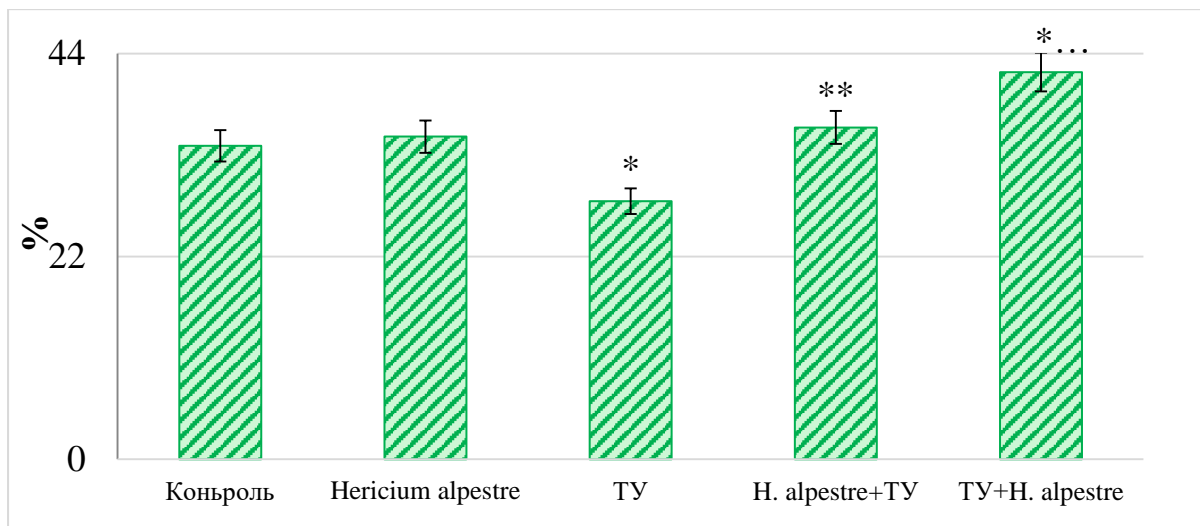


Рис. 3.2. Вміст альбумінів у плазмі крові щурів

У тварин із токсичним ураженням спостерігалось суттєве підвищення рівня α 1-глобулінів (28,2%), що є типовим проявом гострофазової запальної реакції. Уведення екстракту гриба у профілактичній схемі зменшило цей показник до 20,1%, а у лікувальній — до 17%. Це свідчить про проти-запальний вплив *Hericium alpestre*, який, ймовірно, полягає у зниженні продукції гострофазових білків.

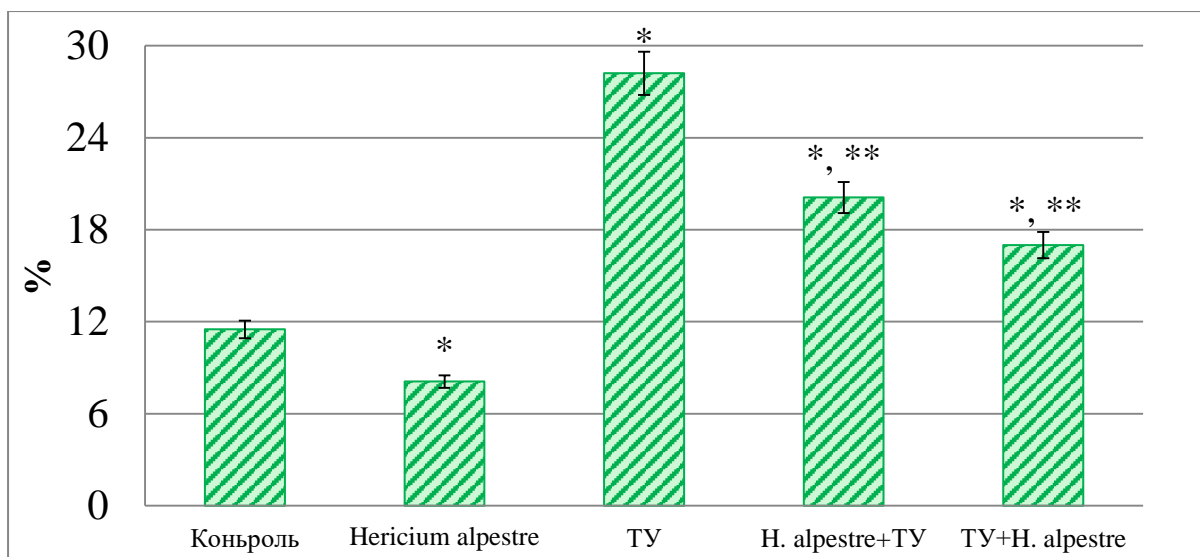


Рис. 3.3. Вміст α1-глобулінів у плазмі крові щурів

Після введення ацетамінофену рівень α2-глобулінів практично не збільшився (контроль — 20%), що може свідчити про менш інтенсивну або локалізовану запальну відповідь, порівняно із зміною рівня α1-глобулінів. При введенні екстракту гриба у схемі ЕГА+ТУ спостерігалось підвищення до 27%, а у ТУ+ЕГА — до 25%. Підвищення рівня α2-глобулінів після введення екстракту *Hericium alpestre* може свідчити про стимуляцію синтетичної функції печінки, покращення гепатоцелюлярного стану та імуномодулюючу дію біоактивних компонентів гриба.

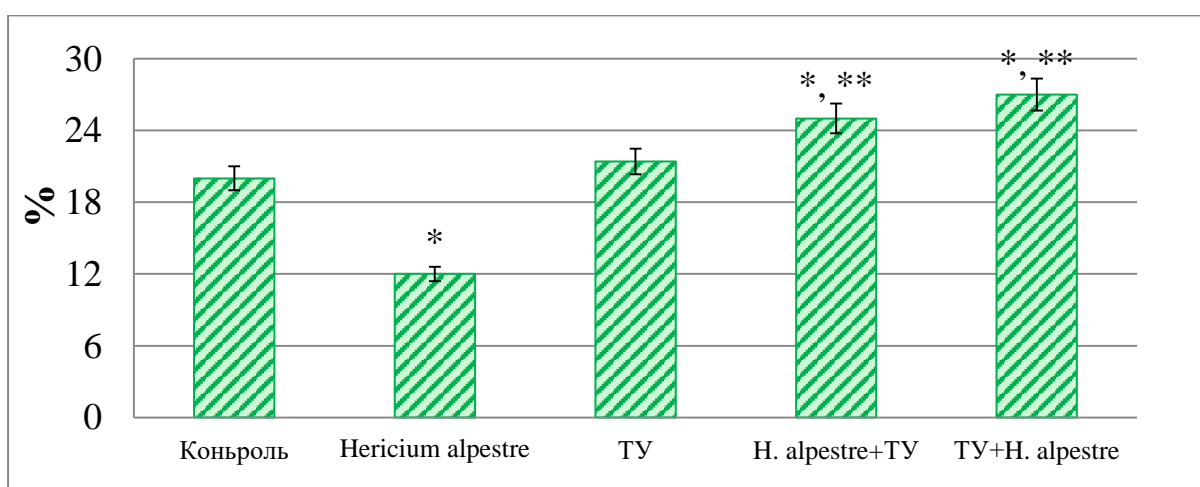


Рис. 3.4. Вміст α2-глобулінів у сироватці крові

У тварин із токсичним ураженням рівень β -глобулінів збільшився до 32%, що може свідчити про активацію системи комплементу або підвищення потреби в транспортних білках. На фоні введення екстракту гриба спостерігалось зниження до 24% у схемі ЕГА+ТУ та до 21% у схемі ТУ+ЕГА, що свідчить про стабілізацію імунологічного статусу організму та зменшення системного запалення.

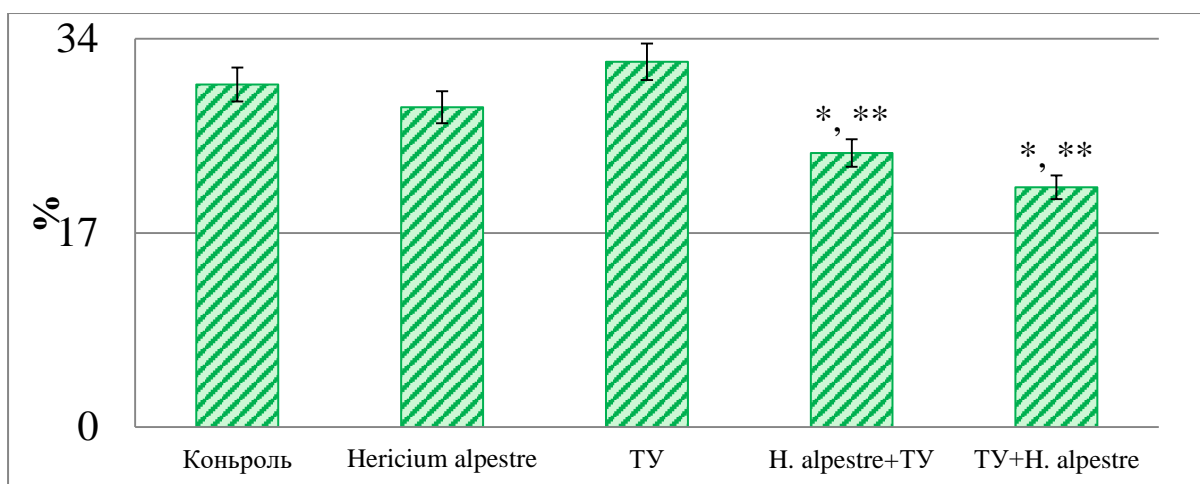


Рис. 3.5. Вміст β -глобулінів

У контрольній групі концентрація γ -глобулінів становила 13%. При застосуванні лише екстракту гриба вона підвищувалась до 17%, що свідчить про його здатність стимулювати гуморальну імунну відповідь. Натомість у тварин з комбінованим ураженням та введенням екстракту (ЕГА+ТУ та ТУ+ЕГА) вміст γ -глобулінів знижувався до 10% і 9,1% відповідно. Така тенденція може бути пов'язана зі зменшенням ступеня тканинного ушкодження і, відповідно, потреби в активації імуноглобулінового ланцюга.

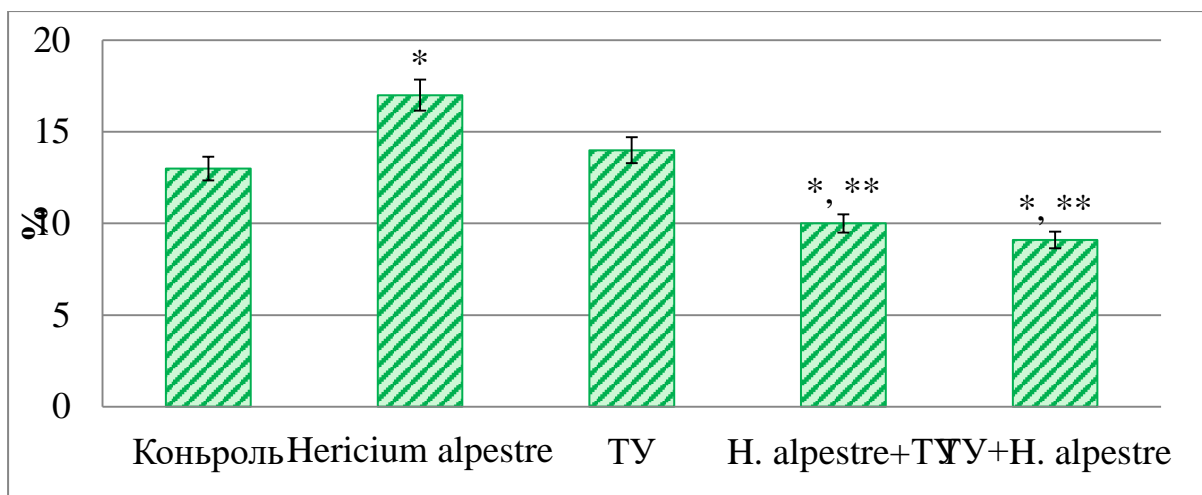


Рис. 6. Вміст γ -глобулінів в плазмі крові

Таким чином, результати експерименту дозволяють припустити, що етанольний екстракт *Hericium alpestre* володіє вираженим гепатопротекторним потенціалом, здатним частково або повністю компенсувати порушення білкового обміну, викликані токсичним ушкодженням печінки. Його позитивний вплив реалізується через стабілізацію загального білка, відновлення співвідношення альбумінів і глобулінів, зменшення запальних зрушень і нормалізацію синтетичної функції печінки.

Однак неоднозначна дія гриба на білковий обмін у здорових тварин свідчить про необхідність подальших досліджень, зокрема для вивчення дозозалежності ефектів, визначення механізмів дії активних компонентів, а також встановлення безпечного діапазону застосування у фізіологічних умовах.

Отже, *Hericium alpestre* може розглядатися як перспективний природний засіб для фармакологічної корекції порушень білкового обміну при медикаментозному токсикозі, з потенціалом для подальшої розробки гепатопротекторних препаратів на його основі.

Висновки

1. Встановлено виражений гепатопротекторний потенціал спиртового екстракту гриба *Hericium alpestre*.
2. Встановлено стабілізацію вмісту загального білка крові, відновлення співвідношення білкових фракцій сироватки крові за дії спиртового екстракту гриба *Hericium alpestre*.
3. Не встановлено достовірних відмінностей досліджуваних показників при превентивному введенні спиртового екстракту гриба *Hericium alpestre* порівняно з введенням після токсичного ураження.
4. *Hericium alpestre* розглядається як перспективний природний кандидат для створення нових гепатопротекторних засобів, ефективних при медикаментозно індукованій гепатотоксичності.

Список використаних джерел

1. Копильчук Г. П. Біохімія крові. *Функціональна біохімія* / Г. П. Копильчук. Чернівці: ЧНУ, 2018. С. 5–6.
2. Міщенко І. В., Павленко Г. П., Коковська О. В. Фізіологія системи крові// Полтава: УМСА, 2019. — 210 с. С.7-9, 30, 117.
3. Сибіль М. Г. Клінічна біохімія : навч. посіб. для студентів вищ. навч. Закладів / Сибіль М. Г. - Львів : ЛДУФК, 2015. - 228 с. С. 51-63.
4. Гусак В. В., Абрят О. Б. Біохімія крові. Короткий курс. Івано-Франківськ, 2023. 47–60 с.
5. Омельченко О. БІОХІМІЯ КРОВІ. Білки плазми крові: гострої фази запалення, власні та індикаторні білки. *Біохімія крові*, Полтава, Україна. Київ, 2021. С. 68–92.
6. Александрова К., Біленький С. ОСНОВИ КЛІНІЧНОЇ БІОХІМІЇ. Запоріжжя, 2011. 69–72 с.
7. Копильчук Г. П. Біохімія крові. *Функціональна біохімія* / Г. П. Копильчук. Чернівці : ЧНУ, 2018. С. 10–13.
8. Plasma Proteins: Chemistry, Structure, Types and Functions. *Biochemistry Den*. 20.02.2025. URL: https://biochemden.com/plasma-proteins/#google_vignette. (дата звернення: 09.01.2025).
9. Nikol Armata. Serum Albumin. *Osmosis*. 06.01.2025. URL: <https://www.osmosis.org/answers/serum-albumin>. (дата звернення: 10.01.2025).
10. *Біологічна хімія* / Л.М. Вороніна, В.Ф. Десенко, Н.М. Мадієвська та ін. — Х., 2000; Губський Ю.І. *Біологічна хімія*. — К.–Тернопіль, 2000.
11. Л.І. Гребеник, І.Ю. Висоцький. БІОХІМІЯ КРОВІ. *Курс лекцій з біохімії* / Л. І. Гребенник. Суми, 2011. С. 80.
12. Crystell Harty. Blood Proteins: Understanding Their Types And Functions. *Medshun*. 2025. 6 квіт.

13. Globulin Definition, Functions & Types. *Study.com*. URL: <https://study.com/learn/lesson/globulins-function-types.html>.
14. Трутаєв С.І, Лакрамі А. Сучасні досягнення фармацевтичної технології. Парацетамол – сучасний, безпечний і ефективний лікарський засіб?- 2023. С. 84.
15. Acetaminophen. *Pubchem*. 16.09.2004.
URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1983>.
16. Acetaminophen. *Drugbank*.
URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00316>
17. Mingzhu Yan, Yazhen Huo. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Pubmed*. 22.04.2018. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29753208/>.
18. M. Fountoulakis P. B. Two-dimensional database of mouse liver proteins: changes in hepatic protein levels following treatment with acetaminophen or its nontoxic regioisomer 3-acetamidophenol. *Pubmed*. 21.06.2000. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10892726/>.
19. Р. Ю. Собко П. С. Б. Клінічний випадок отруєння ацетамінофеном та ацетилсаліциловою кислотою. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 24.11.2024.
URL: <https://pharma-j.org.ua/index.php/pharmtox-j/article/view/133>
20. О. М. Волощук І. С. . Ш. АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ СПИРТОВИХ ЕКСТРАКТІВ ПЛОДОВИХ ТІЛ ГРИБІВ ВИДІВ HERICIUM ALPESTRE, HERICIUM CORALLOIDES. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. 2024. Т. 16.
<https://journals.chnu.edu.ua/biosystems/article/view/639>
21. He, X.R., Wang, X.L., Fang, J.Y., Chang, Y., Ning, N. (2017) Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: a review. *Int J Biol Macromol*, 97, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.040>.

22. Li, G.Q., Liu, Q.H., Wang, X.M., Yang, Y.J. (2014) Antioxidant activity of *Herichium erinaceus* and its effects on antioxidant enzymes and immunity. *J Med Plants Res*, 8 (6), 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.009>.
23. *Herichium erinaceus* Mushroom Extracts Protect Infected Mice against *Salmonella Typhimurium*-Induced Liver Damage and Mortality by Stimulation of Innate Immune Cells // *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(22):5590-6. DOI:10.1021/jf300897w.

Додатки

Техніка безпеки

Вимоги безпеки під час виконання роботи.

Дозволено працювати лише на заземлених об'єктах.

Забороняється:

- встановлювати запобіжники, які не відповідають номінальному значенню;
- виконувати заміни запобіжників при увімкненому обладнанні;
- проводити ремонтні роботи на об'єкті без попереднього відключення живлення;

Під час роботи з центрифугами заборонено:

- перевищувати максимально допустиму частоту обертання ротора;
- використовувати нерівномірно заповнені центрифужні пробірки;
- експлуатувати ротори з вичерпаним терміном дії.

Не запускати жодного приладу без попередньої перевірки його справності. Не залишати працюючий прилад без нагляду.

Щоб уникнути травм через викид реакційної суміші, заборонено заглядати в пробірку чи колбу зверху.

Роботу з отруйними речовинами проводити виключно у витяжній шафі.

Обов'язково дотримуватись запобіжних заходів при роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами.

Заборонено виливати до раковини залишки кислот, лугів, вогнебезпечних рідин тощо. Такі речовини слід зливати до спеціальних склянок, розміщених під витяжною шафою. Не кидати до раковини пісок, папір та інші тверді речовини.

Розчини, що містять кислоти або луки, перед зливом у каналізаційну систему, необхідно попередньо нейтралізувати. Речовини з різким

запахом, а також отруйні сполуки, мають бути знешкоджені шляхом хімічної обробки або знищені шляхом спалювання в спеціально відведеному місці, бажано за межами лабораторії. Не залишати речовин у посуді без підписаних етикеток.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях.

В разі пожежі негайно повідомити відповідальну особу та викликати пожежну службу. Якщо можливо, вимкнути всі електроприлади. Не використовувати воду, якщо горить хімічна речовина або електроприлад. Евакуюватися через найближчий аварійний вихід згідно з планом евакуації.

Вимоги безпеки після закінчення роботи.

По закінченні тієї чи іншої операції необхідно вимкнути газ та електроприлади, що використовувалися під час виконання даної роботи. Посуд, у якому проводили роботу із вогнебезпечними реактивами, після закінчення роботи повинен бути одразу вимитий.

По закінченні роботи привести до ладу робоче місце, прилади та апаратуру, вимкнути головний газовий кран, головний електрорубильник, вентиляцію та світло, а також перевірити, чи видалені з приміщення лабораторії

надлишки горючих та легкозапальних речовин, відпрацьовані рідини, сміття, промаслене ганчір'я, перевірити, чи весь посуд із реактивами закоркований та покладений на відведені місця.