

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

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

**Біохімічні маркери функціонального стану підшлункової залози за умов  
ацетамінофен-індукованої токсичності на тлі превентивного введення  
етанольного екстракту *Hericium alpestre***

**Кваліфікаційна робота**

**Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)**

***Виконала:***

студентка 4 курсу, 400 групи  
спеціальності 091 Біологія  
Поленчук Марія Сергіївна

***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

Бакалаврська робота присвячена вивченню біохімічних маркерів функціонального стану підшлункової залози тварин за умов ацетамінофен-індукованої токсичності та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.

У дослідженні проаналізовано вплив ацетамінофену як фактора, що спричиняє токсичне ураження підшлункової залози, та оцінено можливості корекції цих порушень за допомогою природного біологічно активного засобу – етанольного екстракту *Hericium alpestre*. Оцінку функціонального стану органа проводили на основі змін біохімічних показників, зокрема рівнів альфа-амілази, ліпази та с-реактивного білка.

Результати роботи демонструють, що ацетамінофен-індукована токсичність призводить до значних порушень у роботі підшлункової залози, тоді як введення етанольного екстракту *Hericium alpestre* сприяє відновленню її функції, нормалізації біохімічних показників та зменшенню проявів окисного стресу.

Отримані дані можуть слугувати основою для подальших досліджень щодо застосування природних засобів у корекції патологій підшлункової залози та розробки нових підходів до її захисту при токсичних ураженнях.

**Ключові слова:** підшлункова залоза, с-реактивний білок, ліпаза, альфа-амілаза, ацетамінофен, екстракт *Hericium alpestre*.

## ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to the study of biochemical markers of the functional state of the pancreas of animals under conditions of acetaminophen-induced toxicity and the introduction of ethanol extract of the mushroom *Hericium alpestre*.

The study analyzed the effect of acetaminophen as a factor causing toxic pancreatic damage and evaluated the possibility of correcting these disorders with the help of a natural biologically active agent - ethanol extract of *Hericium alpestre*. The functional state of the organ was assessed based on changes in biochemical parameters, in particular, the levels of alpha-amylase, lipase and c-reactive protein.

The results of the study demonstrate that acetaminophen-induced toxicity leads to significant disorders in the pancreas, while the introduction of ethanol extract of *Hericium alpestre* helps to restore its function, normalize biochemical parameters and reduce the manifestations of oxidative stress.

The data obtained can serve as a basis for further research on the use of natural remedies in the correction of pancreatic pathologies and the development of new approaches to its protection in toxic lesions.

**Keywords:** pancreas, c-reactive protein, lipase, alpha-amylase, acetaminophen, *Hericium alpestre* extract.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	<b>6</b>
<b>РОЗДІЛ 1</b> .....	<b>7</b>
<b>ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.Ацетамінофен-індукована токсичність</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2.Підшлункова залоза-функції та значення</b> . ....	<b>9</b>
<b>1.3. Біохімічні маркери у діагностиці уражень підшлункової залози</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3.1. С-реактивний білок- універсальний маркер запалення</b> . ....	<b>10</b>
<b>1.3.2. Ліпаза як основний біохімічний маркер функціонального стану підшлункової залози</b> . ....	<b>12</b>
<b>1.3.3. Альфа-амілаза: діагностичне значення</b> . ....	<b>13</b>
<b>1.4. Гриби роду <i>Hericium</i> у біомедичних дослідженнях</b> . ....	<b>14</b>
<b>РОЗДІЛ II</b> .....	<b>16</b>
<b>МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1. Матеріали досліджень</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2. Методи досліджень</b> . ....	<b>17</b>
<b>РОЗДІЛ III</b> .....	<b>20</b>
<b>РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ</b> .....	<b>20</b>
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	<b>26</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	<b>27</b>
<b>ДОДАТКИ</b> .....	<b>29</b>
<b>ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ</b> .....	<b>29</b>

## СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.ТЕРМІНІВ.СКОРОЧЕНЬ

N02B E01 – код згідно з анатомо-терапевнично-хімічною класифікацією лікарських засобів, позначає парацетамол

NAPQI – N-ацетил-р-бензохінонімін

СРБ – С-реактивний білок

ТУ – токсичне ураження

*Hericium alpestre* – вид лікарських грибів родини Герицієві

## ВСТУП

Підшлункова залоза відіграє ключову роль у травленні та метаболізмі, а її ураження може призводити до серйозних наслідків для здоров'я людини та тварин.

Ацетамінофен є широко використовуваним анальгетиком, але його передозування може спричинити токсичне ураження органів, зокрема підшлункової залози, через оксидативний стрес і запальні процеси. Водночас природні сполуки, зокрема екстракти лікарських грибів, демонструють перспективні гепато- та панкреопротекторні властивості. Гриб *Hericium alpestre* відомий своїми антиоксидантними протизапальними властивостями, що робить його потенційним засобом захисту підшлункової залози. Дослідження впливу біохімічних маркерів на функціональний стан підшлункової залози за умов токсичності ацетамінофену та введення екстракту *H. alpestre* дозволить оцінити можливість його застосування у ветеринарній та медичній практиці.

Дослідження допоможе обґрунтувати можливість застосування екстракту *H. alpestre* як природного засобу для підтримки функціонального стану підшлункової залози. Визначені біохімічні маркери можуть бути використані для діагностики ступеня ураження підшлункової залози та оцінки ефективності терапевтичних заходів. Отримані дані можуть слугувати основою для подальших досліджень щодо застосування грибних екстрактів у медицині та фармакології.

**Мета роботи** – за допомогою біохімічних маркерів функціонального стану підшлункової залози та універсального маркера запалення виявити ознаки токсичного ураження органа, спричиненого ацетамінофеном, а також оцінити ефективність корекції патологічних змін за допомогою біологічно активного засобу - етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Ацетамінофен-індукована токсичність.

Парацетамол (ацетамінофен) відноситься до фармакологічної групи N02B E01 – ненаркотичних анальгетиків та антипіретиків, є похідним ацетаміду. Чинить протизапальну, знеболювальну та жарознижувальну дію. Входить в протокол лікування лихоманки у дітей, однак іноді трапляються випадки передозування, зумовлені використанням лікарських форм, призначених для дорослих [1].

Парацетамол здобув широку популярність в усьому світі завдяки своїй ефективності як жарознижувальний засіб та препарат для зняття легкого болю. Його короткочасне застосування вважається безпечним і результативним, зокрема в педіатричній практиці. Парацетамол при використанні у звичайній дозі побічні ефекти виявляє рідко, однак він має низький поріг безпечного застосування, тому повторне або надмірне дозування може спричинити токсичне ураження печінки. Крім печінки, токсичне передозування може спричинити ураження нирок, центральної нервової системи, серцево-судинної системи та дихальної. В даному випадку, особливо самолікування, потребує особливої обережності. Згідно з Британським національним формуляром, анальгетична ефективність парацетамолу порівнянна з ацетилсаліциловою кислотою, проте він має менший подразнюючий вплив на шлунково-кишковий тракт, хоч і не проявляє виражених протизапальних властивостей [2].

Після прийому внутрішньо парацетамол швидко абсорбується з травної системи, переважно в тонкому кишечнику, в основному через пасивний транспорт. Після одноразового вживання в дозі 500 мг максимальна концентрація в плазмі крові досягається протягом 30-60 хвилин. Він добре розподіляється в тканинах та в основному в рідких середовищах організму, за

винятком жирової тканини та спинномозкової рідини. Зв'язування з білками плазми крові становить менше 10% і незначно зростає при збільшенні дози. Парацетамол метаболізується переважно в печінці з утворенням глюкуронідів і сульфатів. Сульфатний і глюкуронідні метаболіти не взаємодіють з білками плазми крові, навіть при порівняно високих рівнях концентраціях. Невелика частина метаболізується цитохромом P450 з утворенням проміжного метаболіту N-ацетил-p-бензохіноніміну, що в нормальних умовах швидко знешкоджується відновленим глутатіоном і виводиться із сечею після зв'язування із цистеїном і меркаптопуриною кислотою. N-ацетил-p-бензохінонімін — це гідроксильований метаболіт, що має негативний вплив і утворюється в незначних кількостях у печінці та нирках під дією змішаних оксидаз, детоксикується шляхом зв'язування з глутатіоном, може накопичуватися при передозуванні парацетамолу і спричиняти ушкодження тканин. У дорослих більшість парацетамолу з'єднується з глюкуроною кислотою, тоді як менша частина — з сірчаною кислотою. Ці кон'юговані метаболіти не мають біологічної активності [3].

Гостре передозування виснажує глутатіон в печінці. У результаті чого накопичується NAPQI (N-ацетил-p-бензохінонімін), що спричиняє гепатоцелюлярний некроз і можливо ураження інших органів. Ступінь ризику гепатотоксичності, спричинений гострим прийомом препарату, можна оцінити за кількістю прийнятого препарату, а більш точно — за концентрацією парацетамолу в сироватці крові, особливо в перші 4–24 години після прийому. [4].

Визначення вмісту ацетамінофену в сироватці крові є основою для діагностики та подальшого лікування. Діагностична концентрація в сироватці корисна навіть за відсутності клінічних симптомів, оскільки клінічні симптоми розвиваються згодом. Для оцінки ризику гепатотоксичності після одноразового прийому великої дози ацетамінофену використовується номограма Румака-Метью. Вона дозволяє інтерпретувати концентрацію препарату в залежності від

часу, що минув після прийому, і приймати рішення щодо необхідності введення антидоту - N-ацетилцистеїну.

Її розроблено шляхом аналізу випадків пацієнтів, що перенесли гостре передозування ацетамінофену без застосування антидотної терапії. Концентрація виміряна раніше ніж 4 години може бути не вірною, тому аналіз номограми починають через 4 години після прийому препарату, це час, за який абсорбція ацетамінофену буде повною.

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визнає парацетамол як безпечний анальгетичний засіб і першочерговий препарат для зниження підвищеної температури тіла [5].

За проведеним оглядом літературних джерел встановлено, що парацетамол є ефективним і безпечним лікарським засобом за умови використання в рекомендованих терапевтичних дозах.

## **1.2. Підшлункова залоза-функції та значення.**

Підшлункова залоза — важливий орган травної та ендокринної системи. Це залоза змішаної секреції, яка виконує дві основні функції:

- екзокринну — вироблення травних ферментів;
- ендокринну — синтез гормонів, що регулюють обмін речовин.

Анатомічно залоза поділяється на головку, тіло та хвіст. Її функціональні одиниці — ацинарні клітини (екзокринна частина) та острівці Лангерганса (ендокринна частина). Острівці Лангерганса відіграють ключову роль в регуляції травлення та підтримці гомеостазу глюкози в організмі [6,7].

Екзокринна частина підшлункової залози складається із ацинарних клітин, які синтезують травні ферменти панкреатичного соку та розміщені у функціональних структурах, що називаються ацинусами. Окрім цього, до екзокринного відділу входять протокові клітини, які транспортують ферменти до кишечника. А також центроацинарні клітини, які продукують бікарбонати, деякі іони та муцин.

Ендокринна частина виділяє гормони безпосередньо в кровообіг і відіграє головну роль у регуляції обміну глюкози. Клітини цієї частини — інсулоцити — розташовані на острівцях Лангерганса і представлені:

- $\beta$ -клітинами — продукують інсулін, що знижує рівень глюкози в крові;
- $\alpha$ -клітинами — продукують глюкагон, який підвищує рівень глюкози в крові;
- $\delta$ -клітинами — утворюють соматостатин, що гальмує секрецію інших гормонів;
- F-клітинами — утворюють панкреатичний поліпептид, який впливає на травні функції [8].

Порушення функцій підшлункової залози призводить до ряду захворювань, серед яких панкреатит, цукровий діабет, муковісцидоз та пухлини. Гострий панкреатит супроводжується автолізом тканин залози, тоді як хронічне запалення призводить до фіброзу та зниження функціональності [9]. Цукровий діабет виникає внаслідок дефіциту або нечутливості до інсуліну. Наукові дослідження останніх років спрямовані на вивчення регенеративного потенціалу  $\beta$ -клітин, трансплантацію острівців Лангерганса та біоінженерні підходи до заміщення функції залози [10,11].

Лабораторна діагностика функціонального стану підшлункової залози передбачає дослідження біохімічних показників крові та сечі, зокрема визначення активності основних панкреатичних ферментів. У сироватці крові оцінюють рівні таких ферментів — амілази, ліпази, трипсину [8].

Підвищення рівнів цих ферментів, особливо амілази та ліпази, свідчить про гостре або хронічне запалення підшлункової залози, а також використовується для моніторингу перебігу захворювання та ефективності лікування.

Таким чином, підшлункова залоза є незамінним органом, що відіграє критичну роль у травленні та обміні речовин, а її дисфункції мають серйозні наслідки для здоров'я людини.

### **1.3. Біохімічні маркери у діагностиці уражень підшлункової залози.**

#### **1.3.1. С-реактивний білок- універсальний маркер запалення.**

СРБ — це білок, який належить до групи гострофазових протеїнів, що синтезується у відповідь на запальні процеси в організмі. Назву С-реактивний білок він отримав завдяки здатності зв'язувати С-полісахарид, що міститься в клітинній стінці пневмокока, беручи участь в імунній відповіді. Це явище вперше було описано американськими мікробіологами Вільямом Смітом Тіллетом та Томасом Френсісом, які у 1930 році, у публікації в журналі експериментальної медицини, повідомили про те, що сироватка крові хворих на гостру пневмонію формує преципітат з небілковим компонентом культури пневмокока, який вони назвали "фракція С" [12].

С-реактивний білок синтезується печінкою у відповідь на запальні або некротичні процеси в будь-якій частині людського організму. С-реактивний білок належить до родини пентраксинів — групи білків, що мають характерну будову: вони складаються з п'яти однакових мономерних субодиниць, звідки й походить їх назва. Як представник білків гострої фази запалення, СРБ бере участь у системній запальній відповіді організму. Він має специфічні ділянки зв'язування з іонами металів, зокрема з іонами кальцію, що відіграють важливу роль у його біологічній активності.

Підвищення рівня СРБ у крові — це неспецифічна реакція організму на запальні, інфекційні або некротичні процеси. Завдяки цьому, СРБ розглядається як один з елементів гуморального імунітету та може використовуватись як неспецифічний діагностичний маркер широкого спектра захворювань.

Як центральний білок гострої фази запалення він активує продукцію цитокінінів, зв'язується з фосфоліпідами зруйнованих клітин, активуючи комплемент і наступний їх фагоцитоз, тобто підсилює запальний каскад [13].

Рівень С-реактивного білка в сироватці крові може використовуватись як орієнтир для початку або припинення антибіотикотерапії. При рівні нижче 10

мг/л інфікування відсутнє, тому в проведенні лікування антибіотиками немає необхідності.

Оцінка показників СРБ:

- до 30 мг/л — вірусні інфекції, злоякісні новоутворення, ревматичні хвороби;
- до 100 мг/л — бактеріальні інфекції, загострення ревматичних захворювань, хірургічні втручання;
- до 300 мг/л — опік, сепсис [14].

До засобів, що знижують концентрацію СРБ, належать стероїди та саліцилати, які здатні частково маскувати вираженість запалення [15].

### **1.3.2. Ліпаза як основний біохімічний маркер функціонального стану підшлункової залози.**

Одним із ключових ферментів підшлункової залози є ліпаза. Цей фермент відповідальний за розщеплення тригліцеридів до гліцерину і жирних кислот.

Основні функції ліпази включають:

- перетравлення жирів – панкреатична ліпаза бере участь у травленні, розщеплюючи жири, що надходять із їжею, у тонкому кишківнику [16].
- засвоєння жиророзчинних вітамінів (А, D, Е, К) – допомагає організму використовувати ці вітаміни, які потребують жирового середовища для всмоктування.
- регуляція жирового обміну – ліпопротеїніліпаза розщеплює жири в ліпопротеїнах крові, сприяючи транспортуванню жирних кислот до тканин.
- мобілізація енергії – гормон-чутлива ліпаза активується під час голодування або фізичних навантажень ,розщеплюючи жирові запаси для отримання енергії.
- контроль рівня ліпідів у крові – печінкова ліпаза бере участь у метаболізмі ліпопротеїнів і впливає на рівень холестерину [17].

Ліпаза є травним ферментом, який виділяється в кишківник з підшлункової залози, де він розщеплює тригліцериди на жирні кислоти і

гліцерин перед всмоктуванням. Ліпаза є водорозчинним ферментом. Вимірювання ліпази використовуються в діагностиці і лікуванні захворювань підшлункової залози, таких як гострий панкреатит, обструкція протоки підшлункової залози і пухлини підшлункової залози. При пошкодженні підшлункової залози, ліпаза потрапляє в кров і сечу у великих кількостях [18].

Частина ліпази постійно присутня в крові здорової людини. Нормою вважається показник – 50-175 Од/л. Але в разі запалення підшлункової залози, за її механічного або інфекційного пошкодження, а також за пухлинних процесів відбувається вироблення великої кількості ферменту і викид його в кров. Виявлення ліпази в крові може бути використане, щоб допомогти дослідити або діагностувати гострий панкреатит та інші хвороби підшлункової залози.

Ліпаза при ацетамінофен-індукованій токсичності може спричинити до пошкодження клітин підшлункової залози та викиду ферментів в кров [19,8].

Низький рівень ліпази крові вказує на деструкцію підшлункової залози, зазвичай при цукровому діабеті, і супроводжується зростанням в крові рівнів холестерину та тригліцеридів, гіпертензією, ожирінням і варикозним розширенням вен[8].

### **1.3.3. Альфа-амілаза: діагностичне значення.**

Ще один фермент підшлункової залози – альфа-амілаза.  $\alpha$ -Амілаза представляє собою фермент, який бере участь в розщепленні глікогену і крохмалю.

Основні функції альфа-амілази включають:

1. Гідроліз крохмалю та глікогену – розщеплює альфа-1,4-глікозидні зв'язки в крохмалі та глікогені, утворюючи декстрини, мальтозу та глюкозу.

2. Перетравлення вуглеводів – альфа-амілаза є основним ферментом слини та підшлункової залози, що сприяє попередньому розщепленню вуглеводів ще в ротовій порожнині та подальшому їх розщепленню в тонкому кишківнику.

3.Регуляція рівня глюкози – розщеплення полісахаридів сприяє швидкому засвоєнню глюкози, що використовується організмом як джерело енергії.

4.Участь у травленні та метаболізмі – разом з іншими ферментами запезпечує ефективне перетравлення їжі та всмоктування вуглеводів.

$\alpha$ -Амілаза в організмі людини має два основні джерела-підшлункова та слинні залози.

Приблизно 25 відсотків амілази, яка знаходиться в плазмі крові, виводиться нирками, а інша частина реабсорбується в проксимальних каналцях печінки.

Визначення цього ферменту в сироватці крові проводиться для діагностики та контролю захворювань підшлункової залози, як гострого, так і хронічного панкреатиту. Активність  $\alpha$ -амілази також може характеризувати жовчні або шлунково-кишкові захворювання та інші порушення.

У нормі концентрація альфа-амілази у крові незначна, адже значна його частина присутня у кишечнику.Референтні значення концентрації альфа-амілази в крові дорослої людини - 13-53 Од/л.

Проте через низьку специфічність альфа-амілази, її визначення має проводитися у комплексі з ліпазою, яка є більш точним маркером.Саме поєднання цих двох аналізів дозволяє лікарям побачити більш точну картину стану пацієнта та призначити відповідне лікування.

Зменшення активності даного ферменту відбувається при видаленні підшлункової залози або різкому зниженні її функції, також за наявності муковісцидозу або тяжкого гепатиту [19].

#### **1.4. Гриби роду *Hericium* у біомедичних дослідженнях.**

Гриби цього роду є рідкісними в Європі і тому внесені до Червоних списків деяких країн. В Україні зареєстровані три види роду: *Hericium alpestre Pers.*, *H. coralloides (Scop.) Pers.* та *H. erinaceus (Bull.) Pers* [20].

За попередніми дослідженнями встановлено, що гриби роду *Hericium* мають антиоксидантні, протизапальні та антимікробні властивості.Гриб

*Hericium alpestre* містить антиоксиданти полісахариди та біологічно активні сполуки, які можуть знижувати запальний процес і покращувати функціональний стан підшлункової залози [21].

Хімічний аналіз свідчить про наявність широкого спектра біологічно активних сполук:

1. Полісахариди:

- Бета-глюкани – імуномодулюючі властивості, здатність стимулювати макрофаги та лімфоцити.

- Хітин – сприяє нормалізації мікрофлори кишечника та має пребіотичний ефект.

2. Дитерпеноїди (геріценони і еринацини):

- Геріценони (A–H) та еринацини (A–I) проявляють нейропротекторну активність, стимулюючи синтез нервового ростового фактора (NGF). Дослідження вказують на можливий антидепресантний ефект цих сполук.

3. Фенольні сполуки:

- Флавоноїди та фенольні кислоти, включаючи галову, ферулову, кумарову кислоти, мають антиоксидантні властивості.

- Захищають клітини від окисного стресу, спричиненого активними формами кисню (ROS).

4. Жирні кислоти:

- Лінолева, пальмітинова та олеїнова кислоти сприяють антиоксидантному та протизапальному ефекту.

5. Стероли (ергостерол та його похідні):

- Бере участь у регуляції запальних процесів та метаболізмі холестерину.

6. Амінокислоти та білки:

- Містить всі незамінні амінокислоти.

- Деякі білки проявляють антибактеріальні та противірусні властивості.

*Hericium alpestre* є перспективним об'єктом біомедичних досліджень завдяки своїм антиоксидантним, протизапальним та цитопротекторним

властивостям.Його хімічний склад містить унікальні сполуки, які демонструють корисну біоактивність пов'язану з різними фізіологічними системами організму, включаючи травну, імунну та нервову системи [22].

Особливий інтерес викликають його нейропротекторні та гепатопротекторні ефекти, що робить цей гриб перспективним кандидатом для розробки нових лікарських засобів.Подальші дослідження спрямовані на підтвердження ефективності та безпечності його застосування в клінічній практиці.

## РОЗДІЛ II

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали досліджень.

У дослідженні використано білих безпородних щурів *Rattus norvegicus*, масою 200-300 г.Тварини утримувались в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та корму.

В ході експерименту тварин розділено на групи: I – контроль(К), інтактні тварини; II – тварини, які отримували токсичну дозу ацетамінофену, 1250 мг/кг, у вигляді суспензії у 2% р-ні крохмального гелю(ТУ); III – тварини, яким вводили етанольний екстракт гриба *Hericium alpester* впродовж 14 днів, у концентрації 200 мг/мл, та токсичну дозу ацетамінофену на 15 день(*Hericium alpester*+ ТУ); IV – тварини яким вводили етанольний екстракт гриба *Hericium alpester* впродовж 10 днів, у концентрації 200 мг/мл.

#### Приготування 70% етанольного екстракту гриба *Hericium alpester*.

Гриб *Hericium alpester* наданий Національним природничим парком Гуцульщина, у рамках договору про співпрацю.

Для отримання 70% (об./об.) етанольного екстракту кожен порошкоподібний зразок гриба масою 5 г екстрагували в 50 мл 70% етилового

спирту. Суміш ретельно перемішували та залишали на струшуванні при швидкості 150 об/хв за кімнатної температури протягом 24 годин. Після екстрагування розчин центрифугували при 12 000 об/хв упродовж 15 хвилин. Отриманий супернатант фільтрували через фільтрувальний папір Whatman, після чого фільтрат збирали. Залишок піддавали повторному екстрагуванню в аналогічних умовах. Об'єднаний екстракт концентрували за допомогою роторного випарника Labfreez RE-2000E при температурі 40°C під вакуумом. Отриманий концентрат зберігали в темному місці при температурі 4°C до подальшого використання.

## **2.2. Методи досліджень.**

**Визначення С-реактивного білка в сироватці крові.** «Принцип методу полягає в тому, що частинки латексу, покриті козячими антитілами проти С-реакційного білка людини, підлягають аглютинації в присутності СРБ у досліджуваному зразку. Інтенсивність аглютинації прямо пропорційна до кількості СРБ.

До складу набору (СРБ-латекс-тест) входять вже готові реагенти.

Підігріти реактиви до кімнатної температури. Чутливість тесту може бути знижена при низькій температурі. В окремі лунки предметного скла наносимо по 50 мкл проби, і по одній краплі позитивного і негативного контролю. Акуратно приготувати суспензію СРБ-латексу у флаконі та додати по одній краплі (50 мкл) у кожну лунку. Перемішати розчини паличкою, яка входить до набору, і розмазати по всій поверхні лунки. Розмістити предметне скло на ротатор. Виконати визначення строго по 2 хв експозиції.

Наявність або відсутність аглютинації перевірити після зняття скла із мішалки. Наявність аглютинації підтверджує наявність СРБ у концентрації 6 мг/л або вище» [25].

**Визначення альфа-амілази в сироватці крові.** «Принцип методу полягає в тому що,  $\alpha$ -амілаза розщеплює крохмаль по Літнер з утворенням

продуктів, які не дають кольорової реакції з йодом. Зменшення інтенсивності забарвлення йод-крохмального комплексу за одиницю часу пропорційна до активності ферменту.

Склад набору: реагент 1- фосфатний буфер, 0.2 моль/л, реагент 2- субстрат (крохмаль по Літнер), реагент 3: розчин йоду, 0.1 н.

Перед використанням набір витримати при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Приготування робочого реагенту РР: змішати Р2 з Р1 у співвідношенні 1:24. РР стабільний 14 діб при температурі 2-8° С в непрозорому (темному) посуді. Умови вимірювання: довжина хвилі 640 нм, кювета товщиною оптичного шару 1 см, температура 37°С» [23].

У досліджувану та холосту пробу додати 0,5 мл реакційної суміші Після додавання інкубувати 5 хвилин при 37°С у водному термостаті. У досліджувану пробу додати 0,01 мл досліджуваного матеріалу, у холосту на цьому етапі нічого не додавати. В обидві проби додати 0,05 мл розчину йоду, після додавання знову інкубують 5 хвилин при 37° С. У холосту пробу, вже після додавання йоду, додають 0,01 мл зразка. Для досягнення загального об'єму додати 4,5 мл дистилляту в обидві проби. Виміряти оптичну густину (E) досліджуваної і холостої проб на спектрофотометрі при довжині хвилі 640 нм відносно дистилляту

Активність альфа-амілази визначається за формулою.

$$A_{\text{амілази}}, \text{ мг}/(\text{сек} \times \text{л}) = [(E_{\text{хол.}} - E_{\text{досл.}}) / E_{\text{хол.}}] \times 66,6, \text{ де:}$$

$A_{\text{амілази}}$  – активність альфа амілази в досліджуваному зразку, мг/(сек×л)

$E_{\text{хол}}$  – оптична густина холостої проби

$E_{\text{досл}}$  - оптична густина дослідної проби

F – 66,6 – коефіцієнт перерахунку на кількість крохмалю в мг гідролізованого в пробі в 1 л за 1 сек інкубації [23].

### **Визначення ліпази в сироватці крові (титриметричний метод Тіца)**

Ліпаза, яка міститься в сироватці крові, гідролізує оливкову олію, вивільняючи жирні кислоти. Кількість цих кислот прямо пропорційна активності ферменту. Вивільнені жирні кислоти титрують розчином 0,05 н

NaOH. Зміна кольору індикатора (тимолфталеїну) слугує ознакою завершення реакції.

Для визначення активності ліпази готують дві пробірки — дослідну та контрольну. У кожную з них додають по 0,25 мл дистильованої води та по 0,3 мл попередньо приготовленої стабілізованої суспензії оливкової олії. Далі до обох пробірок додають по 0,1 мл трис-буфера з рН 8,0. Після цього до дослідної пробірки додають 0,1 мл сироватки крові, а до контрольної — не додають.

Пробірки ретельно перемішують і поміщають в термостат для інкубації при температурі 37 °С протягом 6 годин.

Після завершення інкубації до обох пробірок додають по 0,3 мл етанолу, по 1 краплі індикатору (розчину тимолфталеїну), а до контрольної пробірки — додатково ще 0,1 мл сироватки крові (щоб у двох пробірках був однаковий об'єм). Отримані суміші знову ретельно перемішують. У результаті реакційна суміш набуває червоного кольору, що свідчить про наявність жирних кислот, які утворилися внаслідок гідролізу жирів під дією ліпази.

Далі переходять до титрування обох проб 0,05 н розчином гідроксиду натрію (NaOH) до моменту зміни кольору з червоного на жовтий, що вказує на завершення реакції нейтралізації.

Отримані результати використовують для розрахунку активності ліпази за відповідною формулою: Одиниці ліпази (Е) =

(мл 0,05 н NaOH дослідної проби – мл 0,05 н NaOH контрольної проби) × 10 [24].

### **Статистична обробка результатів.**

Статистичний аналіз експериментальних даних здійснювали з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Для обробки результатів застосовували методи варіаційної статистики з обчисленням середнього арифметичного значення (М) та стандартної похибки середнього ( $\pm m$ ). Статистичну значущість відмінностей між групами визначали за допомогою t-критерію Стьюдента з розрахунком рівня достовірності (Р).

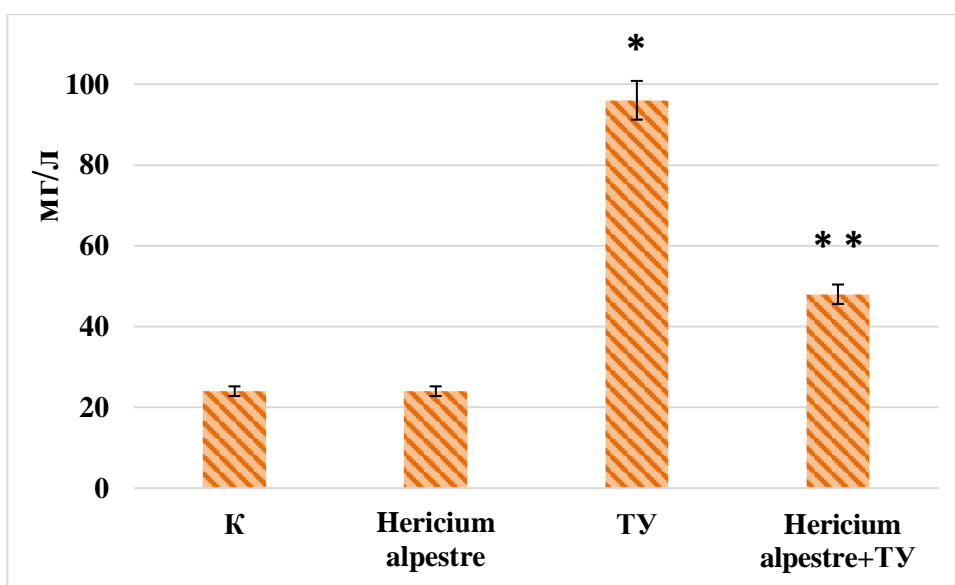
Отримані числові показники та результати їх статистичної оцінки подано у вигляді графіків.

## РОЗДІЛ ІІІ

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У цьому розділі представлено результати експериментального дослідження впливу ацетамінофен-індукованої токсичності на біохімічні показники, що відображають функціональний стан підшлункової залози у лабораторних тварин. Зокрема, аналізували рівень активності альфа-амілази, ліпази та концентрацію С-реактивного білка як основні маркери запалення та функціональної активності підшлункової залози.

Окрему увагу приділено оцінці коригуючого впливу етанолового екстракту *Hericium alpestre* на зміни зазначених біохімічних показників.



**Рис. 1. Вміст С-реактивного білка у сироватці крові щурів**

Примітка: \*-достовірна різниця з групою К

\*\* -достовірна різниця з групою TU

На рис. 1 представлено рівень С-реактивного білка (СРБ) у сироватці крові щурів за різних експериментальних умов.

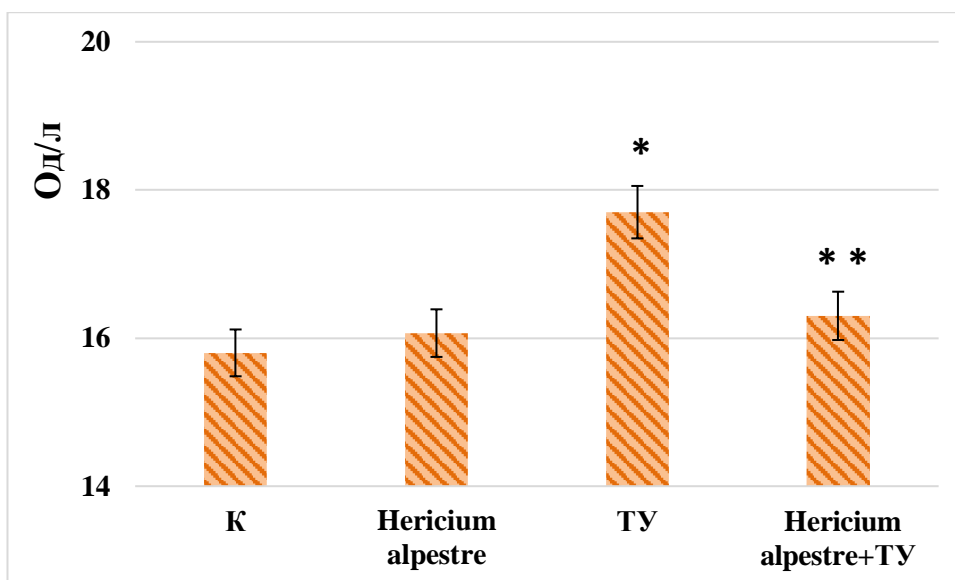
Введення екстракту гриба тваринам не впливало на показники С-реактивного білка, які залишались на рівні контролю. Серед усіх

досліджуваних груп максимальним значенням С-реактивного білка характеризувалась група із токсичним ураженням, у якої значення даного показника перевищувало контроль майже у 5 разів. У 4 групі *Hericium alpester*+ТУ рівень С-реактивного білка перевищував контрольні величини у 2,5 раза. Таким чином превентивне двотижневе введення тваринам екстракту гриба послаблювало дію ацетамінофену, знижуючи рівень запального процесу майже у 2,5 раза.

С-реактивний білок є класичним маркером гострої фази запалення, рівень якого швидко зростає у відповідь на тканинне ушкодження або інфекційне навантаження [12]. Підвищення СРБ у щурів після введення парацетамолу свідчить про системне запалення, викликане гепатотоксичним і, ймовірно, панкреатотоксичним ефектом препарату.

Превентивне введення етанолового екстракту *Hericium alpestre* сприяло зниженню рівня СРБ, що свідчить про протизапальні властивості екстракту. Імовірно, біологічно активні сполуки гриба пригнічують синтез прозапальних цитокінів або стабілізують клітинні мембрани, знижуючи вираженість запальної відповіді.

Таким чином, екстракт *Hericium alpestre* проявляє помірну здатність зменшувати запалення, індуковане парацетамолом, що може свідчити про його потенційну роль як протизапального засобу у комплексній терапії токсичних уражень.



**Рис. 2. Активність ліпази у сироватці крові щурів**

Примітка: \*-достовірність різниці з групою К

\*\* -достовірність різниці з групою ТУ

На рис. 2 наведено рівень активності ліпази в сироватці крові щурів. У контрольній групі (К) активність ліпази становила приблизно 15,5 Од/л.

Аналогічні показники спостерігалися у тварин, яким вводили лише етаноловий екстракт *Hericium alpestre*, що свідчить про відсутність негативного впливу екстракту на даний фермент у здорових тварин.

У групі токсичного ураження парацетамолом (ТУ) активність ліпази достовірно зростала порівняно з контролем, що вказує на розвиток патологічного процесу в підшлунковій залозі.

Введення екстракту *Hericium alpestre* (група “*Hericium alpestre* + ТУ”) сприяло зниженню активності ліпази до рівня, наближеного до контрольного (близько 16 Од/л), що також достовірно відрізнялося від показників групи ТУ.

Ліпаза — фермент, що синтезується підшлунковою залозою і бере участь у травленні жирів [19]. Підвищення її активності в крові є інформативним маркером гострого панкреатиту або іншого ушкодження підшлункової залози. Результати дослідження демонструють, що введення парацетамолу призводить

до порушення панкреатичної функції, що проявляється у вигляді зростання рівня ліпази.

Позитивним є той факт, що введення етанолового екстракту *Hericium alpestre* значно зменшувало рівень активності ліпази в умовах токсичного ураження, що може свідчити про його здатність до зменшення ушкодження підшлункової залози або стимулювання процесів її відновлення. Такий ефект може бути пов'язаний із наявністю у складі екстракту біологічно активних речовин з антиоксидантною та мембраностабілізуючою дією.

Таким чином, *Hericium alpestre* демонструє захисний ефект щодо підшлункової залози при токсичному ураженні парацетамолом, нормалізуючи активність ліпази у сироватці крові.

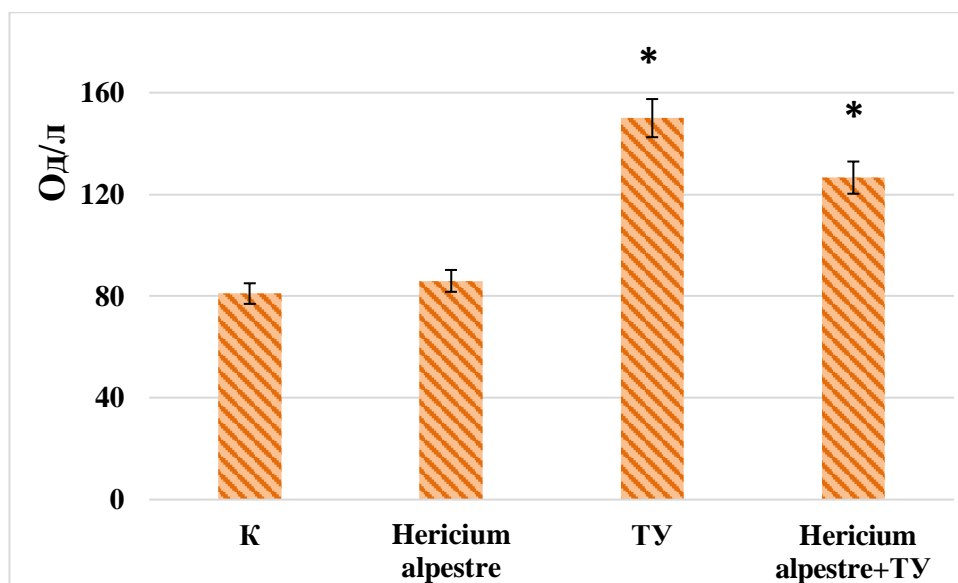


Рис. 3. Активність  $\alpha$ -амілази у сироватці крові щурів

На рис. 3 представлено дані щодо активності  $\alpha$ -амілази у сироватці крові щурів за різних експериментальних умов. У контрольній групі (К) рівень  $\alpha$ -амілази становив приблизно 80 Од/л. У групі, яка отримувала лише екстракт *Hericium alpestre*, активність ферменту була близькою до контрольної, що свідчить про відсутність вираженого впливу препарату на показник у здорових тварин.

У групі токсичного ураження (ТУ), викликаного введенням парацетамолу, спостерігалось достовірне підвищення активності  $\alpha$ -амілази до приблизно 140 Од/л, що вказує на порушення функціонального стану підшлункової залози та розвиток панкреатотоксичності.

Натомість у групі “*Hericium alpestre* + ТУ” рівень  $\alpha$ -амілази був знижений порівняно з ТУ-групою та становив близько 100 Од/л, що також достовірно відрізнялося від значення в групі ТУ, але залишалось вищим за контроль.

Отримані результати свідчать про те, що токсичне ураження парацетамолом супроводжується значним підвищенням активності  $\alpha$ -амілази в сироватці крові, що є характерним біохімічним маркером ушкодження підшлункової залози.

Застосування етанолового екстракту *Hericium alpestre* перед токсичним ураженням привело до помітного зниження активності  $\alpha$ -амілази, що може свідчити про його потенційні захисні властивості щодо підшлункової залози.

Імовірно, антиоксидантні та протизапальні компоненти екстракту сприяли зменшенню ступеня ушкодження тканин та стабілізації клітинних мембран.

Таким чином, екстракт *Hericium alpestre* демонструє здатність частково нормалізувати порушення ферментативної активності при токсичному ураженні парацетамолом, що вказує на його перспективність у корекції медикаментозно індукованих панкреатотоксичних станів.

Отримані результати дослідження рівня ферментативних активностей маркерних ензимів функціонального стану підшлункової залози та неспецифічного маркера запалення вказують на перспективність застосування етанолового екстракту *Hericium alpestre* для корекції медикаментозно індукованих панкреатотоксичних станів

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що екстракт *Hericium alpestre* проявляє помірну здатність зменшувати запалення, індуковане парацетамолом, що може свідчити про його потенційну роль як протизапального засобу у комплексній терапії токсичних уражень.

2. Встановлено захисний ефект *Hericium alpestre* щодо підшлункової залози при токсичному ураженні парацетамолом шляхом нормалізації активності ліпази у сироватці крові.

3. Встановлено, що екстракт *Hericium alpestre* проявляє здатність частково нормалізувати порушення ферментативної активності амілази при токсичному ураженні парацетамолом.

4. Отримані результати дослідження рівня ферментативних активностей маркерних ензимів функціонального стану підшлункової залози та неспецифічного маркера запалення вказують на перспективність застосування етанолового екстракту *Hericium alpestre* для корекції медикаментозно індукованих панкреатотоксичних станів

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ен-Наххасі М., Гриненко В. В., Семченко К. В., Криванич О. В. Збірник матеріалів XIV науково-практичної конференції "Управління якістю в фармації"-2020.-С. 198.
2. Perrot S, Cittée J, Louis P, et al. Self-medication in pain management: The state of the art of pharmacists' role for optimal Over-The-Counter analgesic use. *Eur J Pain*. 2019. 23(10). P.1747-1762
3. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу [Електричний ресурс].Режим доступу:<https://likicontrol.com.ua>-Дата звернення:23.01.2025.
4. Gerald F OMalley, DO, Grand Strand Regional Medical Center/Rika O'Malley, MD, Grand Strand Medical Center. 2022.
5. Трутаєв С.І, Лакрамі А. Сучасні досягнення фармацевтичної технології.Парацетамол – сучасний, безпечний і ефективний лікарський засіб?-2023.-С.84.
6. Guyton A.C., Hall J.E. *Textbook of Medical Physiology*. 13th ed. Elsevier, 2016.
7. Mescher A.L. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 15th ed. McGraw-Hill, 2021.
8. Хоперія В.Г., Харченко О.І., Синельник Т.Б., Костюк О.С., Остапченко Л.І. Клінічна лабораторна діагностика. Клінічна біохімія: підручник. — К.: ННЦ "Інститут біології та медицини", 2022.С.442-478.
9. Petrov M.S. "Pancreatitis: causes, diagnosis and treatment." *Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2019; 4(1): 36–45.
10. Shapiro A.M.J. et al. "Clinical islet transplantation for the treatment of diabetes." *Nature Reviews Endocrinology*, 2021; 17(3): 139–150.
11. Zhou Q., Melton D.A. "Pancreas regeneration." *Nature*, 2018; 557(7705): 351–358.

12. Р.Редькін, Н.Орловецька, О.Данькевич. Журнал: Фармацевт практик. Стаття ‘С-реактивний білок – маркер діагностики та тригер імунітету’.2019,С.30-31.

13. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein / S. Verma, S. H. Li, M. V. Badiwala [et al.] // *Circulation*. – 2022. – V. 105. – P. 564–569

14. Аналіз на С-реактивний білок [Електричний ресурс].Режим доступу: <https://medikom.ua>- Дата звернення:23.01.2025.

15. H.-H. Zhou, Y.-L. Tang, T.-H. Xu, B. Cheng.C-reactive protein: structure, function, regulation, and role in clinical diseases // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15.

16. Y. Zhao, X. Wang, H. Li, T. Zhang.Pancreatic lipase and its related proteins: where are we now // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2023. – Vol. 1878.

17. Доровський Д. А.Роль печінкової ліпази у зворотному транспорті холестерину // *Український біохімічний журнал*. – 2014. – № 16. – С. 17–22.

18. Пескова Л. О., Дехтяренко Н. В. Фермент ліпаза: аналіз галузей використання, продуцентів, способів одержання // *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. – 2014. – № 3(95). – С. 63–72.

19. Гусак В. В., Абрат О. Б.Біохімія крові.-2023.-С.102./90.

20. Згонник М., Перші знахідки рідкісних грибів *Hericium alpestre* та *H. coralloides* з Національного природного парку «Синьогора»// *Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»* (м. Львів, 7-9 жовтня 2022 р.). – Львів: ЛНУ, 2022. – С. 47-48.

21. Пирог Т.П., Скроцька О.І., Пенчук Ю.М. Гриби роду *Hericium* як перспективні біологічні агенти природоохоронних біотехнологій.-2016.-С.267-274.

22. Butkhup L., Samappito S., Kumla J., Suwannarach N., Lumyong S.  
Unveiling the chemical composition and biofunctionality of *Hericium* spp. fungi: a comprehensive overview // *Journal of Fungi*. – 2024.
23. Інструкція з використання набору реагентів для визначення активності альфа-амілази за методом Каравея в сироватці [Електричний ресурс].Режим доступу: <https://granum.ua>- Дата звернення:27.01.2025.
24. Горячковський.А.М.Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці.Довідковий посібник.Одеса. –2005.-С.274-275.
25. Інструкція для визначення рівня СРБ у сироватці крові [Електричний ресурс].Режим доступу: <https://diameb.ua>- Дата звернення:27.01.2025.

## 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 луги, 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.