

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

**МАРКЕРИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ НИРОК ЩУРІВ ЗА УМОВ  
ВВЕДЕННЯ ТОКСИЧНИХ ДОЗ АЦЕТАМІНОФЕНУ ТА ЕКСТРАКТУ  
ГРИБА *HERICIAM APLESTRE***

**Дипломна робота**  
**Рівень вищої освіти – другий (магістерський)**

**Виконала:**

студентка VI курсу, групи 200М  
спеціальності 091-біологія та біохімія  
освітня програма – біохімія та  
лабораторна діагностика

**Баранюк Тетяна Миколаївна**

**Керівник:** к.б.н., доц. О. М. Волощук

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № \_\_\_\_  
від „ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

зав. кафедри \_\_\_\_\_ доц. Волощук О.М.

## АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню біохімічних маркерів функціонального стану нирок у щурів за умов передозування ацетамінофеном та введення екстракту гриба *H. alpestre*.

Показано, що передозування ацетамінофеном призводить до порушення функціонального стану нирок, про що свідчить підвищення вмісту сечовини у сироватці крові у понад два рази та вмісту креатиніну майже втричі порівняно з показниками контрольної групи на тлі активації продукування активних форм кисню у мітохондріях, структурно-функціонального ушкодження біомолекул мітохондрій, що підтверджується зростанням ТБК-активних продуктів та карбонільних похідних протеїнів. Водночас попереднє введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* призводить до достовірного зниження інтенсивності утворення АФК у мітохондріях нирок, пригнічення реакцій окисного ушкодження біомолекул, а також до покращення екскреторної функції нирок (зниження рівня сечовини та креатиніну у крові). Введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* також забезпечує збереження архітекtonіки нирки, про що свідчить зменшення відсотка колабованих клубочків з понад 80% у токсичній групі до приблизно 20% у групі з попередньою терапією. Отримані результати свідчать, що збереження мітохондріальної функції є критичним для запобігання некрозу та структурній цілісності ниркових тілець за умов передозування ацетамінофеном.

**Ключові слова:** нирки, ацетамінофен, *H. alpestre*, сечовина, креатинін, мітохондрії, активні форми кисню, ТБК-активні продукти, карбонільні похідні

## ABSTRACT

The Master's thesis investigates biochemical markers of renal functional status in rats following acetaminophen overdose and the administration of *Hericium alpestre* extract.

It is shown that acetaminophen overdose leads to impairment of renal functional status, evidenced by an over twofold increase in serum urea and an almost threefold increase in creatinine compared to control values. This occurs concurrently with the activation of reactive oxygen species (ROS) production in the mitochondria and structural-functional damage to mitochondrial biomolecules, confirmed by the increase in TBA-reactive substances (TBARS) and protein carbonyl derivatives.

Conversely, the prior administration of the ethanolic extract of the mushroom *Hericium alpestre* leads to a significant decrease in the intensity of ROS formation in kidney mitochondria, the inhibition of oxidative damage reactions in biomolecules, and improvement in renal excretory function (reduction of urea and creatinine levels in the blood). Administration of the *Hericium alpestre* ethanolic extract also ensures the preservation of kidney architectonics, as evidenced by the reduction in the percentage of collapsed glomeruli from over 80% in the toxic group to approximately 20% in the group with prophylactic treatment. The obtained results indicate that preserving mitochondrial function is critical for preventing necrosis and maintaining the structural integrity of renal corpuscles under conditions of acetaminophen overdose.

**Key words:** kidney, acetaminophen, *Hericium alpestre*, urea, creatinine, mitochondria, reactive oxygen species, TBA-reactive substances, protein carbonyl derivatives.

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

\_\_\_\_\_ Т.М. Баранюк  
(підпис)

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Біохімічні маркери функціонального стану нирок.....	7
1.2. Механізми нефротоксичної дії ацетамінофену .....	11
1.3. Гриби як потенційне джерело сполук з терапевтичною активністю.....	16
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
2.1. Об'єкт та методи дослідження.....	20
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	24
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	35
ДОДАТКИ.....	46

## ВСТУП

Гостре ураження нирок (ГУН) – поширений критичний клінічний стан, пов'язаний зі значною захворюваністю, рецидивами та смертністю. Характеризується швидкою та тривалою втратою функції нирок, що виникає внаслідок численних патологічних впливів. Нирковий фіброз, який визначається як надмірне накопичення колагену та проліферація фібробластів у тканинах нирок, сприяє структурним пошкодженням та функціональному порушенню нирок, відіграючи ключову роль у розвитку хронічної хвороби нирок (ХХН). Нирки відіграють важливу роль у підтриманні гомеостазу шляхом екскреції кінцевих продуктів метаболізму (зокрема, сечовини, креатиніну та сечової кислоти), а також забезпечують кислотно-лужну рівновагу плазми крові та підтримують водно-сольовий баланс через регуляцію осмотичного тиску [1].

Знеболювальний та жарознижувальний засіб ацетамінофен (*N*-ацетил-*n*-амінофенол, АРАР) широко використовується у клінічній практиці для дорослих та дітей. Він безпечний при застосуванні в терапевтичних дозах [2]. Хоча він дуже ефективний, проте при передозуванні проявляє гепатотоксичні та нефротоксичні властивості як у людей, так і у тварин [2]. Недавні дослідження показують, що оксидативний стрес і запалення відіграють важливу патофізіологічну роль у нирковій токсичності, спричиненій ацетамінофеном [3 – 8]. Відомо, що гостре передозування ацетамінофеном може спричинити потенційно смертельне гостре ураження нирок, проте механізм ураження нирок, спричиненого ацетамінофеном, залишається не до кінця з'ясованим. Відомо, що метаболіти ацетамінофену, насамперед *N*-ацетил-*n*-бензохінонімін (NAPQI) або *n*-амінофенол, володіють підвищеною здатністю зв'язуватися з протеїнами клітин та виснажувати запаси глутатіону, посилюючи нефротоксичність [9]. Було продемонстровано, що введення АРАР призводить до активації ядерного фактора каппа В (NF-κB) у каналцевих клітинах і, зрештою, викликає запалення нирок [10]. Актуальним залишається питання пошуку речовин природнього походження, які здатні

знижувати інтенсивність запалення у нирках та сприяти відновленню функціональної активності нирок. Історично лікарські гриби демонстрували виражені терапевтичні властивості, що зумовлено наявністю у їх складі біологічно активних сполук. Їстівні гриби мають приємний смак, аромат, текстуру, тоді як некультивовані лікарські гриби використовувалися переважно в охороні здоров'я для лікування простих захворювань та пандемічних захворювань [11, 12]. Біологічно активні сполуки з грибів виявляють протигрибкові, антибактеріальні, антиоксидантні та противірусні властивості, а також використовуються як інсектициди та нематоциди. У науковій літературі детально описано наявність різних біоактивних вторинних метаболітів у гриба *Hericium*, включаючи феноли, полікетиди, терпени, полісахариди, ліпополісахариди, глікопротеїни, пірони, алкалоїди, терпеноїди, стероїди та нерибосомні пептиди [13]. Однак гриб *H. alpestre* практично не вивчений. Цей гриб занесений до Червоних книг деяких європейських та азійських країн, тоді як інформація про біологічні ефекти його екстрактів практично відсутня.

**Метою** роботи стало дослідження біохімічних маркерів функціонального стану нирок у щурів за умов передозування ацетамінофеном та введення екстракту гриба *H. alpestre*.

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

1. Визначити вміст сечовини та креатиніну в крові як маркерів функціонального стану нирок тварин за умов передозування ацетамінофеном та введення екстракту гриба *H. alpestre*.

2. Визначити маркери окиснювального стресу у мітохондріях нирок за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення екстракту гриба *H. alpestre*.

3. Проаналізувати результати гістологічного зрізу нирок за досліджуваних умов.

## РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Біохімічні маркери функціонального стану нирок

Нирки – важливі гомеостатичні органи, що є частиною сечовидільної системи. Вони фільтрують близько 200 літрів рідини щодня. Нирки виконують багато важливих функцій. Вони очищають кров від токсинів та продуктів метаболізму. До поширених продуктів життєдіяльності належать азотисті сполуки (сечовина, креатинін). Нирки також контролюють кислотно-лужний баланс (рН баланс) крові; синтезують ренін, який бере участь у регуляції кров'яного тиску; у них відбуваються певні етапи синтезу гормонів кальцитріолу та еритропоетину. Кальцитріол – це форма вітаміну D, яка допомагає організму засвоювати кальцій. Еритропоетин допомагає організму виробляти еритроцити. Кожна нирка містить понад мільйон фільтруючих одиниць, які називаються нефронами. Кожен нефрон складається з клубочків. Клубочки – це групи крихітних кровоносних судин, які виконують перший етап фільтрації крові. Потім вони передають відфільтровані речовини до ниркових каналців. Цей процес називається клубочковою фільтрацією. Ниркові каналці – це крихітні трубочки, які реабсорбують і повертають воду, поживні речовини та мінерали, необхідні організму (включаючи натрій і калій). Канальці виводять метаболіти, включаючи надлишок кислот та рідини, за допомогою процесу, який називається дифузією.

Нирка виконує низку важливих функцій для підтримки гомеостазу. Багато з маркерів, які зараз використовуються у клінічній практиці, використовуються десятиліттями, хоча останніми роками відбулося відкриття нових біомаркерів, які дозволяють покращити оцінку функції нирок і виявити їх пошкодження на ранніх стадіях. Для цього використовують такі показники як швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ), а також вимірювання екскреції білка в сечі, візуалізації нирок та, за необхідності, біопсії нирки.

Історично сечовина була першим маркером, який використовувався для офіційної оцінки функції нирок. Сечовина є основною формою азотистих сполук в організмі. Вона є продуктом метаболізму амінокислот і майже

повністю виводиться із сечею. Незважаючи на те, що спочатку було відкрито десятиліттями раніше, у 1827 році Річард Брайт був першим, хто пов'язав накопичення сечовини в крові з її зменшенням у сечі в осіб із хворими нирками [14]. Кількісне визначення азоту сечовини крові (BUN) було зрештою введено в клінічну медицину як діагностичний тест на початку 1900-х років. Хоча оцінка BUN залишається широко використовуваним показником для оцінки функції нирок, зараз, як правило, вважається, що це субоптимальний маркер для цієї мети. Підвищені концентрації BUN можуть спостерігатися в ряді умов, які безпосередньо не пов'язані зі змінами ШКФ. Наприклад, сечовина легко реабсорбується каналцями, особливо під час дефіциту об'єму, що призводить до підвищення концентрації в плазмі при збереженні ШКФ. Крім того, підвищення концентрації BUN може спостерігатися при підвищеному споживанні білка з їжею, гіперкатаболізмі, застосуванні кортикостероїдів або шлунково-кишкової кровотечі. Тому інтерпретацію концентрації BUN необхідно ретельно розглядати в клінічному контексті.

Сироватковий креатинін витіснив BUN для оцінки функції нирок у середині минулого століття і залишається найбільш широко використовуваним лабораторним тестом для оцінки ШКФ. Креатинін утворюється з відносно постійною швидкістю в результаті неферментативної дегідратації м'язового креатину і тому приблизно пропорційний м'язовій масі. Креатинін вільно фільтрується клубочком і не реабсорбується нирковими каналцями; однак він секретується зі змінною швидкістю. Такі препарати, як циметидин і триметоприм, пригнічують каналцеву секрецію креатиніну. Більш проблематичним є той факт, що каналцева секреція креатиніну збільшується пропорційно відносно його клубочкової фільтрації, коли функція нирок знижується, що призводить до значного завищення справжньої ШКФ. У результаті підвищення рівня креатиніну в сироватці крові може не спостерігатися, доки не відбудеться суттєве зниження ШКФ. Додаткові обмеження щодо використання сироваткового креатиніну для оцінки ШКФ виникають через значну варіабельність продукування креатиніну. Історично

існувала значна варіабельність щодо вимірювання креатиніну сироватки, що, як правило, призводило до менш точної оцінки ШКФ, коли концентрація креатиніну сироватки була в межах референтного інтервалу або трохи перевищувала його [15]. У 2008 році Національна освітня програма із захворювання нирок (NKDEP) у співпраці з IFCC та Європейською конфедерацією клінічної хімії запустила програму стандартизації креатиніну, щоб зменшити міжлабораторну варіабельність калібрування аналізу креатиніну [16].

Виміряні концентрації кількох білків з низькою молекулярною масою, включаючи  $\beta_2$ -мікроглобулін, цистатин С і  $\beta$ -білок (ВТР), були оцінені як потенційні маркери ШКФ. Загалом ці білки вільно фільтруються клубочком, реабсорбуються та катаболізуються, але не виділяються нирковими каналцями. У результаті зниження ШКФ пов'язане зі збільшенням концентрації в плазмі.  $\beta_2$ -мікроглобулін – це білок 11,8 кДа, який є легким ланцюгом молекули МНС I, що експресується на клітинній поверхні всіх ядерних клітин. Він відділяється від важкого ланцюга під час клітинного метаболізму та надходить у кровообіг у вигляді мономера.  $\beta_2$ -мікроглобулін фільтрується в клубочку і майже повністю реабсорбується та катаболізується проксимальними тубулярними клітинами [17]. На відміну від креатиніну, його сироваткові концентрації не залежать від віку та м'язової маси [18]; однак очевидної переваги  $\beta_2$ -мікроглобуліну над сироватковим креатиніном у виявленні невеликих змін ШКФ немає [19]. Основним фактором, що обмежує корисність  $\beta_2$ -мікроглобуліну як маркера функції нирок, є його неспецифічність, оскільки відомо, що концентрації  $\beta_2$ -мікроглобуліну в сироватці крові підвищуються при деяких злоякісних пухлинах і запальних станах [18, 20].

Сироватковий цистатин С викликав значний ентузіазм в останні роки як маркер ШКФ. Цистатин С – це білок з низькою молекулярною масою, що складається з 122 амінокислот і належить до групи інгібіторів цистеїнової протеїнази [21]. Він виробляється з постійною швидкістю всіма ядерними

клітинами і вільно фільтрується клубочком, реабсорбується і катаболізується, але не виділяється нирковими канальцями [21]. На відміну від креатиніну, концентрація цистатину С у сироватці крові не залежить від віку, статі та м'язової маси [22]. Цистатин С може бути більш надійним, ніж методи, засновані на сироватковому креатиніні, для оцінки ШКФ, особливо в тих осіб з незначним зниженням ШКФ, у яких зазвичай не спостерігається змін креатиніну сироватки (так званий сліпий діапазон ШКФ щодо креатиніну) [23]. Цистатин С також може бути кращим за креатинін в оцінці смертності та серцево-судинних наслідків [24]. Повідомлялося, що цистатин С підвищується швидше, ніж креатинін, після зниження ШКФ, що дозволяє раніше ідентифікувати ГНН [25, 26].

Зовсім недавно сироватковий ВТР був досліджений як маркер ШКФ. ВТР (також відомий як простагландин D2-синтаза) – це білок з низькою молекулярною масою, який з постійною швидкістю виробляється гліальними клітинами центральної нервової системи [27]. Він вільно фільтрується клубочком і реабсорбується проксимальними канальцями з мінімальною позанирковою елімінацією [28]. Нещодавні дослідження показують, що сироваткові концентрації ВТР працюють на рівні, подібному до креатиніну та цистатину С, не лише для оцінки ШКФ, але й для прогнозування прогресуючої ниркової дисфункції [29].

Використовуючи поняття ниркового кліренсу, можна точно оцінити ШКФ за допомогою ендогенних або екзогенних речовин. Нирковий кліренс певної речовини – це об'єм плазми, який може бути повністю очищений від цієї речовини за одиницю часу [30].

Клінічне обстеження може бути використане для оцінки функції нирок. Це пояснюється тим, що у людини з порушенням функціонування нирок виникає набряк через нездатність нирок регулювати водний баланс. Можуть з'явитися ознаки хронічної хвороби нирок, які можна використовувати для оцінки її тяжкості, наприклад, високий кров'яний тиск, остеопороз або анемія.

Якщо нирки не здатні виводити сечовину, у людини може розвинутися поширений свербіж або сплутаність свідомості.

Частина оцінки функції нирок включає вимірювання об'єму сечі та її складу. Порушення функції нирок може призвести до вироблення занадто великої або занадто малої кількості сечі. Здатність нирок фільтрувати білок часто вимірюється за допомогою рівня альбуміну в сечі або рівня білка в сечі [2] який вимірюється або одноразово, або, через коливання протягом дня, за допомогою 24-годинних аналізів сечі.

Аналізи крові також використовуються для оцінки функції нирок. До них належать тести, призначені для безпосереднього вимірювання функції нирок. Тести, які можуть оцінити функцію нирок, включають оцінку рівня електролітів, таких як калій та фосфат, оцінку кислотно-лужного стану шляхом вимірювання рівня бікарбонату та оцінку загального аналізу крові на анемію.

## **1.2. Механізми нефротоксичної дії ацетамінофену**

Ацетамінофен (АРАР) є найпоширенішим препаратом у багатьох країнах світу. У 2005 році було зареєстровано понад 165 000 випадків інтоксикації ацетамінофеном. Приблизно 67 000 з них були зумовлені вживанням лише ацетамінофену, і 37% траплялися у дітей. Інші 98 000 були комбінованим вживанням, найчастіше з опіоїдами, і частіше зустрічалися у дорослих [31]. Обмежені дані ретроспективної серії випадків педіатричних пацієнтів з отруєнням ацетамінофеном свідчать про те, що пов'язана з цим нефротоксичність може бути частішою у дітей та підлітків [32]. При значній гепатотоксичності, викликаній ацетамінофеном, часто спостерігається ураження нирок. Підвищення рівня креатиніну на 2,0 мг/дл було відмічено у значної частини пацієнтів з енцефалопатією та коагулопатією, що виникли внаслідок фульмінантної печінкової недостатності, індукованої ацетамінофеном [33]. Первинна токсичність ацетамінофену є результатом метаболізму препарату як у печінці, так і в позапечінкових тканинах [34].

Лише 1% препарату виводиться з сечею в незміненому вигляді. При терапевтичному дозуванні у дорослих приблизно 63% ацетамінофену метаболізується шляхом глюкуронізації та 34% шляхом сульфатування. Ці реакції фази II відбуваються переважно в печінці та призводять до утворення водорозчинних метаболітів, які виводяться через нирки. При терапевтичних дозах 5% відсотків АРАР окислюється мікросомальною ферментною системою Р-450 до реактивного проміжного продукту, N-ацетил-*n*-бензохіноніміну (NAPQI). При терапевтичному дозуванні цей електрофільний метаболіт потім відновлюється глутатіоном і згодом виводиться у вигляді меркаптурової кислоти, відносно нетоксичної сполуки. При надлишку АРАР запаси сульфату та глутатіону виснажуються. Це перенаправляє більшу частину ацетамінофену до змішаної функціональної оксидазної системи СYP-450, що призводить до утворення більшої кількості реактивних проміжних продуктів NAPQI. При вживанні великих доз препарату спостерігається серйозніше виснаження глутатіону, а також масове утворення метаболітів, що посилює токсичність, залишаючи велику кількість реактивних частинок незв'язаними. Ці електрофільні проміжні продукти потім утворюють аддукти з сульфгідрильними та глутатіоновими фрагментами на клітинних білках [35]. Цей процес порушує гомеостаз з подальшою активацією каспаз та лізосомних ферментів, які ініціюють апоптоз, або запрограмовану загибель клітин. Це було продемонстровано як у печінці, так і в тканині нирок на тваринних моделях. Загибель клітин призводить до некрозу тканин і, зрештою, до дисфункції органів [36, 37]. Механізм токсичності ацетамінофену добре описаний у печінці, але менш чітко вивчений у нирках. Існує кілька потенційних механізмів ниркової токсичності, заснованих як на даних тварин, так і людей. Можливі механізми включають шлях цитохрому Р-450, а також ферменти простагландинсинтетази та N-деацетилази [36].

Мікросомальні ферменти СYP-450, що беруть участь у цьому процесі, знаходяться як у печінці, так і в нирках, хоча вони дещо відрізняються в кожному органі. Тяжкість ураження нирок та кількість реактивних адуктів у

тканинах можуть бути значно зменшені при застосуванні інгібітора CYP-450 піперонілбутоксиду [35]. Крім того, було зазначено, що стани, пов'язані з підвищеною активністю системи CYP-450, посилюють токсичність ацетамінофену. Прикладами є хронічне вживання алкоголю та прийом препаратів, що індують ці ферменти, таких як протисудомні засоби [38].

Ізофермент CYP-450, який в основному бере участь у біотрансформації в нирках, є CYP 2E1, який індукується тестостероном. Це відкриття пояснює значну гендерну відмінності в метаболізмі та токсичності ацетамінофену в нирках тваринних моделей [39]. Було помічено, що самці мишей та самки мишей, попередньо оброблені тестостероном, мали більшу ймовірність утворення токсичних метаболітів та демонстрації нефротоксичності, ніж необроблені самки мишей. Остаточного зв'язку між статтю та нефротоксичністю у людей не було виявлено.

Було висловлено припущення, що цей процес не залежить від процесу в печінці, оскільки ниркова токсичність була продемонстрована на ізольованих зрізах нирок мишей [40], а в деяких випадках захворювання нирок виникало за відсутності значної гепатотоксичності [41, 42].

Важливим елементом у детоксикації ацетамінофену та його метаболітів, його кон'югати були залучені до утворення нефротоксичних сполук. Моделі на тваринах продемонстрували, що нефротоксичність, індукована АРАР, може бути пом'якшена шляхом пригнічення метаболізму або транспорту цих кон'югатів. Невідомо, чи пошкодження нирок безпосередньо зумовлене кон'югатом ацетамінофен-глутатіон, чи одним з його метаболітів.

Інша можливість полягає в тому, що утворення цих кон'югатів може сприяти виснаженню глутатіону, що може пригнічувати детоксикацію реактивних метаболітів. Ці результати не були відтворені в печінці, що свідчить про дискретний, селективний механізм кон'югатів глутатіону та виснаження глутатіону при захворюванні нирок, індукованому ацетамінофеном [43].

Інший потенційний механізм токсичності ацетамінофену пов'язаний з простагландин ендопероксидазною синтетазою (PGES), хоча її ефект може бути більш суттєвим при хронічному, а не при гострому перебігу. PGES – це фермент, що знаходиться в нирках, який активує АРАР до токсичних метаболітів, найімовірніше, NAPQI. Цей процес більш виражений у мозковій речовині нирки, тоді як цитохром P450 відіграє важливішу роль у корі. Незважаючи на ці незначні відмінності, кінцева точка двох шляхів однакова – утворення токсичних метаболітів, ковалентне зв'язування з клітинними білками, після чого настає загибель клітин і некроз тканин. Цей процес був продемонстрований як на людських, так і на тваринних моделях. PGES зв'язується з АРАР з такою високою афінністю, що реактивні метаболіти утворюються навіть у терапевтичних дозах.

Клінічні наслідки цього відкриття ще не з'ясовані. Фермент N-деацетилаза також пов'язаний з нефротоксичністю, індукованою ацетамінофеном, хоча його роль досі невідома. Відомо, що фермент діє на АРАР або NAPQI, деацетилюючи його субстрат до *p*-амінофенолу, який потім перетворюється на вільний радикал, здатний зв'язуватися з клітинними білками. Цей процес може відбуватися в поєднанні з дією ферментної системи CYP-450 та був продемонстрований на тваринних моделях [44].

Рідко біопсія нирок проводиться з діагностичною метою при нефропатії, індукованій АРАР. На тканинному рівні ці токсини найчастіше вражають проксимальні каналці, хоча захворювання може бути більш дифузним. Світлова мікроскопія біоптатів нирок у пацієнтів з токсичністю ацетамінофену та нирковою недостатністю демонструє некроз епітеліальних клітин каналців як у проксимальних, так і в дистальних частинах каналців [45]. У деяких випадках світлова мікроскопія демонструє нормальні клубочки та судини, але з уламками та пошкодженням базальної мембрани. При флуоресцентній мікроскопії не виявляється відкладення імуноглобулінів або комплекменту. Електронна мікроскопія є важливою для виявлення втрати щіткової облямівки

канальців з набряком канальців та порушенням організації мітохондрій [45, 46].

Аналіз сечі може бути використаний для диференціації цієї від інших причин ниркової недостатності, таких як гепаторенальний синдром (ГРС) або преренальна азотемія. При ГРС осад сечі матиме зернисті циліндри зі змінною гематурією або піурією. Визначення натрію в сечі та осмоляльність можуть надати додаткову інформацію. При ГРС рівень натрію в сечі зазвичай становить 20 ммоль/л, з осмоляльністю, подібною до осмоляльності плазми. При ГРС та преренальній етіології рівень натрію в сечі становить 10 ммоль/л, а осмоляльність вища, ніж у плазмі.

У кількох клінічних випадках було зроблено спробу визначити пацієнтів з підвищеним ризиком нефротоксичності, викликаній ацетамінофеном. Хоча дані обмежені, припускають, що пацієнти з групи ризику можуть бути подібними до тих, хто має ризик гепатотоксичності: пацієнти з дефіцитом глутатіону через такі причини, як голодування або алкоголізм. Крім того, препарати, що індують ферментну систему СYP-450, можуть погіршити токсичність, збільшуючи утворення цих проміжних продуктів [38]. Підлітки та молоді дорослі можуть бути більш схильні до ниркової недостатності при передозуванні АРАР; однак причина цього висновку неясна [32].

Ці клінічні випадки також надали цінну інформацію щодо клінічного перебігу нефропатії, викликаній АРАР. Початок ниркової недостатності, як правило, коливається від 1 до 8 днів, хоча більшість випадків були зареєстровані між 2 та 5 днями після прийому. Тенденції рівня креатиніну в сироватці крові демонстрували пікові рівні, що досягаються в середньому через 7 днів після прийому препарату, з діапазоном від 3 до 16 днів. У більшості пацієнтів функція нирок повернулася до початкового рівня протягом 1 місяця. Приблизно 1% пацієнтів потребували діалізу як тимчасового заходу. Це частіше траплялося у пацієнтів з поліорганною недостатністю та іншими супутніми захворюваннями, і, менш імовірно, у пацієнтів з ізольованою нирковою дисфункцією.

При характеристиці цих тенденцій необхідно також враховувати супутні фактори, які спостерігалися в багатьох клінічних випадках, такі як одночасний прийом інших нефротоксичних препаратів, зневоднення, наявна дисфункція печінки або нирок, поліорганна недостатність, хронічне вживання препаратів, що містять АРАР, та похилий вік [47].

Отже, нефропатія, викликана ацетамінофеном, іноді виникає у пацієнтів, які вживали ацетамінофен, хоча вона не так добре охарактеризована, як гепатотоксичність. Механізми некрозу в обох органах схожі, проте існують деякі тонкі відмінності, які залишаються незрозумілими. У пацієнтів може спостерігатися ізольована ниркова токсичність або полісистемна органна недостатність. Клінічний перебіг зазвичай завершується одужанням, але як тимчасовий захід може знадобитися гемодіаліз. Ретельний анамнез та фізичне обстеження з виявленням факторів ризику, підтримуюча терапія та серійний моніторинг діурезу, артеріального тиску та маркерів клубочкової фільтрації є важливими для лікування.

### **1.3. Гриби як потенційне джерело сполук з терапевтичною активністю**

Рід *Hericium* належить до родини *Hericiaceae*, ряду *Russulales* та класу *Agricomycetes*. Він включає близько 15 видів, які макроскопічно відрізняються наявністю розгалужених та нерозгалужених гіменофорних структур, що підтримують колючки різної довжини, поширенням в одиночних та множинних скупченнях, а мікроскопічно – наявністю базидіоспор, орнаментованих амілоїдом [48]. Вид *Hericium erinaceus*, також відомий як Лєвова грива, привернув найбільшу увагу з моменту його раннього документування в традиційній східній медицині сотні років. В рамках зростаючого світового інтересу до лікарських грибів та їх ймовірних властивостей, що сприяють здоров'ю, когнітивні переваги *H. erinaceus* були перевірені в клінічних випробуваннях, що додатково продемонструвало загальну тенденцію до покращення психічного стану [49, 50].

Хоча численні дослідження підтвердили чудові терапевтичні властивості грибів *Hericium spp.*, вкрай важливо всебічно оцінити їхній профіль безпеки та потенційні ризики, пов'язані з їх використанням. Експериментальні аналізи, зосереджені на дії компонентів міцелію *H. erinaceus*, свідчать про їхню безпеку та відсутність побічних ефектів [51, 52]. Наприклад, Чен та ін. провели дослідження субхронічної токсичності та генотоксичності препарату екстракту  $\beta$ -глюкану *H. Erinaceus* на щурах. Результати не виявили значних токсикологічних ефектів, пов'язаних з лікуванням, за різними параметрами, включаючи клінічні спостереження, офтальмологічні обстеження, збільшення маси тіла, споживання корму, вагу органів, гематологію, хімію сироватки, аналіз сечі та результати термінальної некропсії. На основі субхронічного дослідження рівень, при якому не спостерігається побічної дії, для препарату екстракту  $\beta$ -глюкану *H. Erinaceus* був визначений як 2000 мг/кг маси тіла на день, що було найвищою протестованою дозою [53]. Аналогічно, Лі та ін. продемонстрували, що споживання стандартизованого міцелію *H. erinaceus*, збагаченого еринацином А, не становить генотоксичної небезпеки для людей, що підтверджується тестами на мутагенність *in vitro* та аналізами *in vivo* (мікроядерний аналіз еритроцитів мишей) [54].

У дослідженні, проведеному Лі та ін., вивчалася ефективність та безпека екстракту міцелію *H. erinaceus* (ЕАНЕ), що містили еринацин А як активний інгредієнт, у лікуванні пацієнтів з легким перебігом хвороби Альцгеймера. Їхні результати показали, що після 49 тижнів лікування пацієнти, які отримували ЕАНЕ, демонстрували покращення когнітивних здібностей за допомогою вищого скринінгового інструменту, міні-обстеження психічного стану та інструментальних показників активності повсякденного життя порівняно з пацієнтами в групі плацебо. Важливо, що дослідження дійшло висновку, що препарат є безпечним, добре переноситься та може бути важливим для досягнення нейрокогнітивних переваг [55].

Види *Hericium* демонструють виняткову кількість структурно різноманітних біоактивних компонентів, що містяться як у їхніх плодових тілах, так і в міцелії [56]. Варто зазначити, що хімічний склад може змінюватися залежно від методів культивування та природних середовищ існування. Наприклад, дослідження Гуана та ін. показали, що штучно культивовані плодові тіла *H. coralloides* містять приблизно 33% полісахаридів, 16% сирого протеїну, 12% загальної золи, 8% редукуючих цукрів, 6% сирого жиру, 5% сирої клітковини, 3% загальних тритерпеноїдів, 1% загальних сапонінів, 0,88% загальних флавоноїдів та 0,5% загальних алкалоїдів. Загальний вміст стеролів та фенолів також був виміряний на рівні 0,43% та 0,18% відповідно [57, 58]. Раніше було продемонстровано, що плодові тіла *H. erinaceus* містять приблизно 61,1% загальних вуглеводів та 20,8% білка, тоді як біомаса міцелію містить близько 43,9% загальних вуглеводів та 42,5% білка [59]. Ян та ін. ідентифікували близько 102 сполук з плодових тіл *H. erinaceus*, включаючи органічні кислоти, нуклеотиди та аналоги, амінокислоти, вуглеводи та їх похідні, флавоноїди, ненасичені жирні кислоти, терпеноїди, фенольні кислоти, фенілпропаноїд та стероїди [60]. Автори також припустили, що флавоноїди, які були якісно виявлені в аналізі (лютеолін, апігенін, діосметин, гіспідулін та акацетин), можуть функціонувати як активні компоненти в *H. erinaceus*, ґрунтуючись на попередніх дослідженнях, які продемонстрували фармакологічні функції флавоноїдів, що включають нейропротекцію, покращення навчання та пам'яті, протизапальну дію тощо [61 – 63]. Крім того, рід *Hericium* багатий на біоактивні хімічні речовини, такі як полісахариди, алкалоїди, гериценони, еринацини, герицерини, резорциноли, стероїди, моно- та дитерпени, а також коралоцини [64 – 68]. Широкі дослідження підкреслюють терапевтичний потенціал *Hericium*, демонструючи помітні антиоксидантні, протизапальні, антимікробні, протидіабетичні та протиракові властивості. Крім того, ці гриби демонструють багатообіцяючі ефекти в лікуванні когнітивних розладів, хвороби

Альцгеймера, ішемічних інсультів, хвороби Паркінсона (ХП), депресивних розладів та вікових порушень [69, 70 – 73].

Повідомлялося, що *Hericium alpestre*, ще один рідкісний вид роду *Hericium*, містить цітанові дитерпеноїди [74] та фенольні сполуки [75, 76], причому перші, як було виявлено, стимулюють вироблення фактора росту нервів та нейротрофічного фактора мозку [74], а другий має протиракову активність [75, 76].

## РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Об'єкт та методи дослідження

Дослідження проводили на білих щурах масою ~ 250 г, яких утримували за вільного доступу до води. Експерименти проводилися на тваринах відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідження чи в інших наукових цілях» (Стразбург, 1986 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Тварини були розділені на 4 групи:

- 1 група контроль (К) – контрольні тварини;
- 2 група – тварини, яким моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном (ТУ);
- 3 група (ЕГА) – тварини, яким вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла протягом 10 діб;
- 4 група (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.

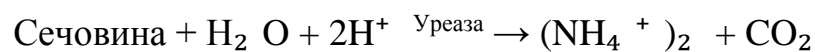
#### Отримання сироватки крові

Для отримання сироватки кров у щурів забирали з печінкової вени і переносили в центрифужні пробірки. Після цього для кращої ретракції тромба пробірки з кров'ю витримували 30 хвилин при температурі 37 °С. Надалі сироватку відокремлювали шляхом центрифугування зразків при 3000 об/хв 15 хвилин. Готову сироватку відразу ж використовують для аналізу.

## Робота на біохімічному аналізаторі НТІ Biochem FC-120

Дослідження зразків проводили на автоматичному біохімічному аналізаторі НТІ Biochem FC-120 (США) на базі кафедри біохімії та біотехнології.

Принцип методу визначення вмісту *сечовини* базується на реакції гідролізу сечовини в кислому середовищі на іони амонію ( $\text{NH}_4^+$ ) і вуглекислий газ ( $\text{CO}_2$ ). Іони амонію, що утворюються взаємодіють з  $\alpha$ -кетоглутаратом в реакції, що каталізується глутаматгідрогеназою (GLDH) з одночасним окисненням NADH до  $\text{NAD}^+$ :



Зниження концентрації NADH прямопропорційно концентрації сечовини в зразку.

Принцип методу визначення вмісту *креатиніну* базується на взаємодії креатиніну з пікратом натрію, реакція Яффі. Креатинін взаємодіє з пікратом натрію в лужному середовищі з утворенням червоно-оранжевого комплексу. Швидкість утворення забарвлення пропорційна концентрації креатиніну в зразку.

### Виділення мітохондрій з нирок тварин

Нирки гомогенізували у буфері А (0,25 М сахароза; 0,03 М трис HCl (pH 7,4), 0,001 М EDTA). Центрифугували 10 хв при 4000 об/хв. Надосад збирали і центрифугували 15 хв при 12000 об/хв. Осад заливали буфером В (1 М трис HCl (pH 7,4), 0,25 М сахароза) і центрифугували 10 хв при 12000 об/хв. Осад повторно промивали буфером В. Осад – суспензія мітохондрій.

### Визначення ТБК-активних продуктів

МДА, реагуючи з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) у кислому середовищі під час нагрівання, утворює забарвлений комплекс, який має максимум поглинання при  $\lambda = 532$  нм. Суспензію мітохондрій у кількості 100

мкл вносили у пробірку та доводили об'єм до 2500 мкл буферним розчином. Далі додавали до суміші 1000 мкл 17% трихлороцтової кислоти та центрифугували 15 хв при 4000 г. Отриманий супернатант відбирали у кількості 2000 мкл і додавали 1 мл 0,8% ТБК та інкубували у киплячій водяній бані 10 хв до появи рожевого забарвлення. Оптичну густину виміряли спектрофотометрично при  $\lambda = 532$  нм.

### **Визначення карбонільних похідних протеїнів**

Суть методу полягає у реакції між окисненими амінокислотними залишками та 2,4-дінітрофенілгідразином (ДНФГ), у результаті якої утворюються 2,4-дінітрофенілгідрозони. У дослідну та контрольну пробірки вносили по 0,05 мл мітохондрій у кожену. В обидві пробірки додавали по 1 мл трихлороцтової кислоти та центрифугували 5 хв при 3000 об/хв, надосад зливали. У дослідну пробірку додавали 1 мл 2,4-ДНФГ до осаду, у контрольну – 1 мл 2М HCl до осаду, та інкубували обидві протягом 1 год при  $t=37^{\circ}\text{C}$  та центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. До осаду додавали 1 мл розчину етанол:етилацетату у співвідношенні 1:1 і центрифугували 5 хв при 3000 об/хв. Отриманий осад промивали ще 2 рази. До осаду додавали 4 мл 8М сечовини і нагрівали на водяній бані до розчинення. Вміст пробірок вимірювали на спектрофотоколориметрі при  $\lambda=370$  нм.

### **Визначення швидкості продукції $\text{HO}^{\bullet}$**

У пробірки вносили 2 мл інкубаційного середовища, що містило 20 ммоль дезоксирибози, 1 ммоль  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 20 ммоль натрій-фосфатного буфер (pH 7,4), та 200 мкл суспензії мітохондрій, інкубували 30 хв при  $t=37^{\circ}\text{C}$ . Після інкубації додавали 0,5 мл 1% розчину ТБК, приготовленого на 50 ммоль NaOH, та 0,5 мл 2,8% ТХО. Суміш інкубували 20 хв на водяній бані 10 хв. Після охолодження вміст пробірок вимірювали на спектрофотометрі при  $\lambda=532$  нм.

### **Визначення супероксидного аніон радикала**

Суть методу полягає у відновленні нітросинього тетразолію (НСТ) супероксид-аніон радикалом з утворенням забарвленого диформазану, який характеризується максимумом поглинання при  $\lambda = 540$  нм. Відбирали по 0,05 мл мітохондрій. У першу пробірку вносили 0,05 мл мітохондрій та 0,05 мл буферного розчину (для визначення фонові нестимульованої активності), у другу пробірку – 0,05 мл 3% розчину НАДН (для оцінки продукції  $O_2^-$  мітохондріальним ЕТЛ). Далі перемішували та інкубували 10 хв при  $t=37^\circ C$ . Додавали по 0,05 мл 0,2% НСТ на буфері та перемішували, інкубували 5 хв при  $t=37^\circ C$ . Додавали 2 мл розчинника (хлороформ:диметилсульфоксид, співвідношення 1:2) та взбовтували 1 хв, після чого центрифугували 5 хв при 1500 об/хв. Відбирали супернатант, фотометрію 1 мл верхнього шару проводили проти контролю відповідно при  $\lambda=540$  нм.

**Статистичну обробку результатів** проводили за допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважали результати, якщо  $p \leq 0,05$ .

### РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Актуальним залишається питання пошуку речовин природного походження, які здатні попереджувати ушкодження нирок за умов їх токсичного ураження. Пошук нових нефропротекторних агентів залишається актуальним завданням, оскільки існуючі засоби часто не забезпечують достатнього захисту ниркової тканини від оксидативного та запального ушкодження. Природні джерела, зокрема лікарські гриби, привертають особливу увагу завдяки комплексній дії та низькій токсичності. Гриби роду *Hericium* розглядаються як перспективний об'єкт через їх доведені антиоксидантні властивості. Екстракти та полісахариди грибів роду *Hericium* мають значний антиоксидантний і органопротекторний потенціал. У експериментальних моделях ушкодження нирок (наприклад, ішемія-реперфузія або діабетичне ураження) попередня пероральна терапія полісахаридами *Hericium erinaceus* спричинювала зниження показників азотемії (BUN) та сироваткового креатиніну, підвищення кліренсу креатиніну, зменшення маркерів ліпідної пероксидації (MDA) та відновлення рівнів ендогенних антиоксидантів (GSH, SOD, GSH-Px). Це свідчить, що нефропротективний ефект обумовлений головним чином здатністю компонентів *Hericium* зменшувати оксидативний стрес і запалення в ниркових тканинах [77 – 79]. У нашій лабораторії попередньо було показано, що етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre in vitro* виявляє антиоксидантну активність, що робить перспективним подальше вивчення цього виду *in vivo* як потенційного нефропротектора.

Результати проведеного дослідження показали, що передозування ацетамінофеном призводить до порушення функціонального стану нирок, про що свідчить підвищення вмісту сечовини у сироватці крові у понад два рази (рис. 1) та вмісту креатиніну майже втричі (рис. 2) порівняно з показниками контрольної групи.

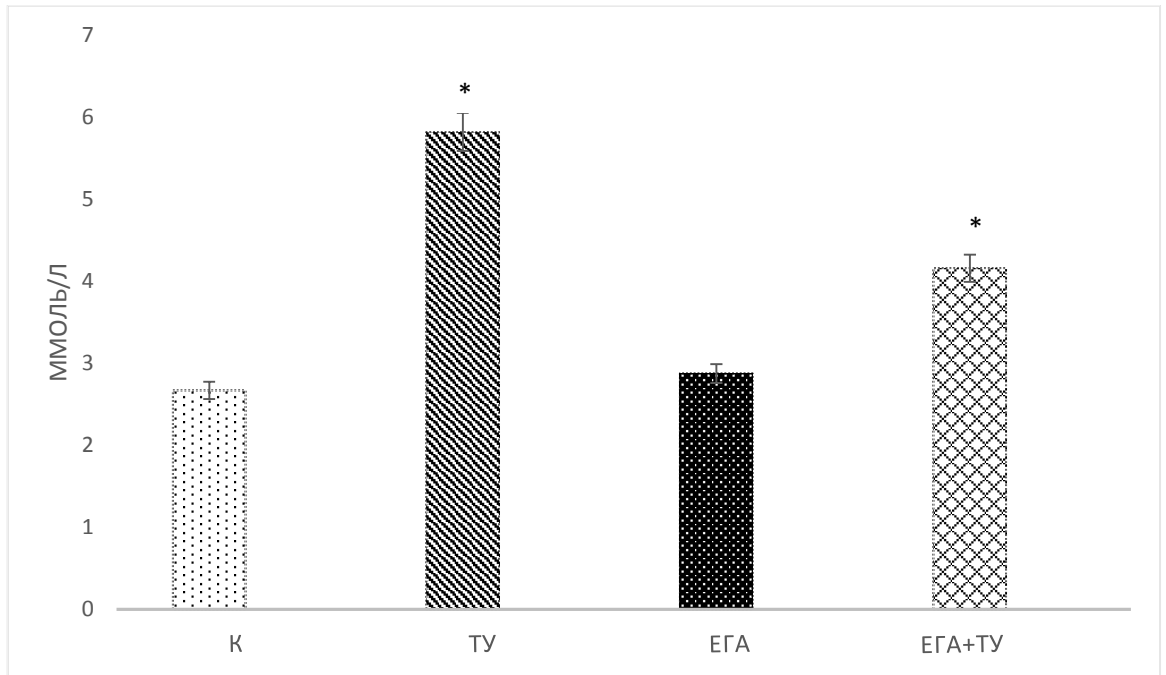


Рис. 1 Вміст сечовини у сироватці крові тварин за умов токсичного ураження ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre*

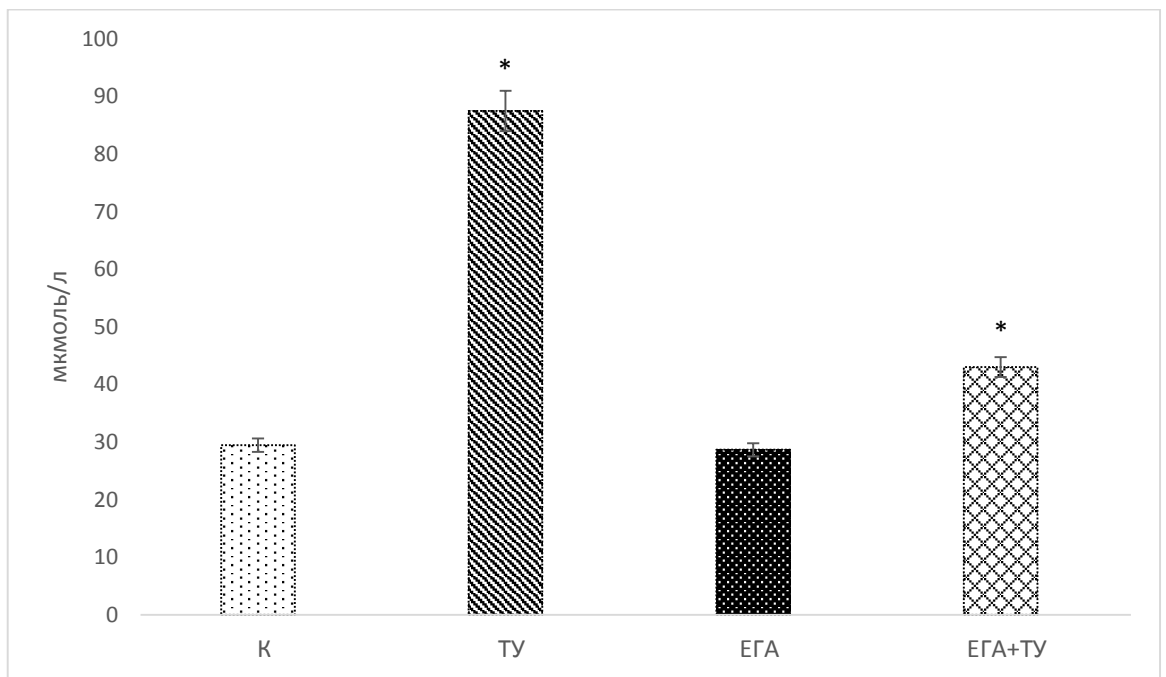


Рис. 2 Вміст креатиніну у сироватці крові тварин за умов токсичного ураження ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre*

Відомо, що сечовина – це основний продукт азотистого обміну, що утворюється внаслідок катаболізму амінокислот. Основними органами, які беруть участь в підтриманні балансу сечовини в організмі, є печінка та нирки. Традиційно вважається, що сечовина бере участь у процесі обміну білків та

осморегуляції. Найважливішим аспектом є участь у регуляції швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), артеріального тиску, репродуктивної функції, апоптозу, окиснювального стресу, запалення та фіброзу [80 – 83]. Останніми роками все більше досліджень показують, що рівень азоту сечовини (BUN) не лише є відображенням функції нирок, а й може бути пов'язаний із запальним станом організму.

Креатинін – це нітрогеновмісний метаболіт, який виробляється у складі нормальних м'язових клітин, слугуючи кінцевим продуктом метаболізму креатину (Crn) та фосфокреатину (PCrn), і виводиться шляхом екстрауренальної деградації та екскреції з сечею [84]. Концентрація креатиніну сироватки крові (СКр) є найбільш використовуваним клінічним показником для оцінки швидкості клубочкової функції (ШКФ). Його широке використання ґрунтується на кореляції його концентрації з точним вимірюванням ШКФ з використанням кліренсу таких речовин, як інулін (золотий стандарт) [85]. Широка доступність, технічна простота та низька вартість вимірювання креатиніну сприяють його використанню в рутинній оцінці функції нирок.

Незважаючи на ці практичні переваги, креатинін має обмеження як маркер ШКФ. До них належать неточність традиційних методів кількісного визначення, які спираються на хімічні реакції (Яффе), схильні до взаємодії з іншими молекулами. Деякі ліки, такі як циметидин, триметоприм та абемацикліб, пригнічують каналцеву секрецію креатиніну, конкуруючи за шляхи секреції, тим самим підвищуючи рівень креатиніну та призводячи до помилкових оцінок ШКФ (зниження) [86].

Сечовина та креатинін вважаються ключовими маркерами функціонального стану нирок, оскільки вони є кінцевими продуктами азотистого обміну, що виводяться переважно шляхом клубочкової фільтрації. Креатинін утворюється внаслідок розпаду креатинфосфату в м'язах і виділяється нирками практично без реабсорбції, тому його концентрація в плазмі відображає рівень швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ).

Підвищення рівня креатиніну є показником зниження клубочкової фільтрації та погіршення ниркової функції.

Сечовина утворюється в печінці в циклі сечовини як продукт детоксикації аміаку. Незважаючи на те, що її рівень може коливатися залежно від дієти, катаболізму чи гідратації, вона також широко використовується для оцінки ниркової функції, оскільки за нормальних умов видаляється нирками шляхом фільтрації та часткової реабсорбції. Підвищення концентрації сечовини (азоту сечовини крові) є індикатором зниження ниркової екскреції, особливо у поєднанні з підвищеним креатиніном.

Таким чином, зміна рівнів креатиніну та сечовини в крові є одними з найбільш інформативних та клінічно значущих показників, що свідчать про порушення функції нирок та розвиток гострої або хронічної ниркової недостатності [87 – 89].

Відомо, що в основі токсичної дії ацетамінофену лежить його здатність індукувати вільнорадикальні процеси. Ацетамінофен у терапевтичних дозах є безпечним, однак при надмірному надходженні він метаболізується в печінці системою цитохрому P450 з утворенням реактивного та токсичного метаболіту N-ацетил-*p*-бензохіноніміну (NAPQI). У нормі цей метаболіт швидко знешкоджується шляхом кон'югації з глутатіоном, утворюючи нетоксичні сполуки, які потім виводяться із сечею. Проте при передозуванні ацетамінофену запаси глутатіону виснажуються, і надлишковий NAPQI починає ковалентно зв'язуватися з білками клітин (особливо мітохондріальними), що призводить до посилення утворення вільних радикалів, оксидативного стресу та структурно-функціонального ушкодження клітин печінки та нирок. Таким чином, ключовим механізмом токсичної дії ацетамінофену є утворення NAPQI та недостатність глутатіонової системи, що заважає його повному знешкодженню [90 – 92].

Результати проведених досліджень показали, що за умов передозування ацетамінофеном у мітохондріях нирок посилюється продукування основних активних форм кисню. Зокрема, інтенсивність продукування супероксиду

підвищується майже втричі (рис. 3), тоді як продукування гідроксильного радикалу зростає у понад 1,5 рази (рис. 4).

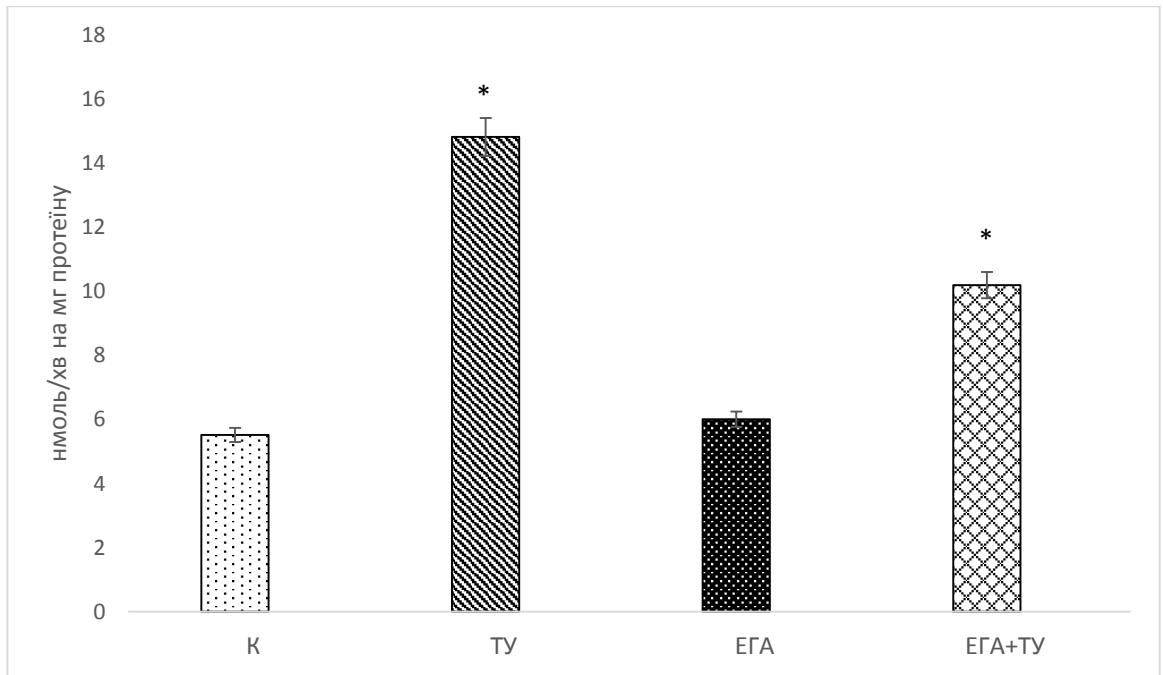


Рис. 3 Швидкість утворення супероксидного аніон-радикалу ( $O_2^{\cdot -}$ ) в мітохондріях нирок тварин за умов токсичного ураження ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre*

Супероксид-аніон радикал ( $O_2^{\cdot -}$ ) – це реактивний кисневий радикал, що утворюється при одноелектронному відновленні молекулярного кисню. Він є одним із перших продуктів окиснення в клітинах і слугує джерелом для утворення інших, більш реактивних форм кисню (наприклад, пероксиду водню та гідроксильного радикалу). Супероксид може пошкоджувати білки, ліпіди та ДНК, але також виконує роль сигнальної молекули [93].

Гідроксильний радикал ( $HO^{\cdot}$ ) – один із найреактивніших та найбільш небезпечних для клітини реактивних кисневих радикалів. Утворюється переважно в результаті реакції Фентона (за участю  $Fe^{2+}$ ) або в реакції Хабер-Вайса між супероксидом і пероксидом водню. Через надзвичайно високу реактивність гідроксильний радикал миттєво реагує з будь-якими біомолекулами – ліпідами, білками, ДНК, викликаючи тяжкі структурні ушкодження та мутації [94].

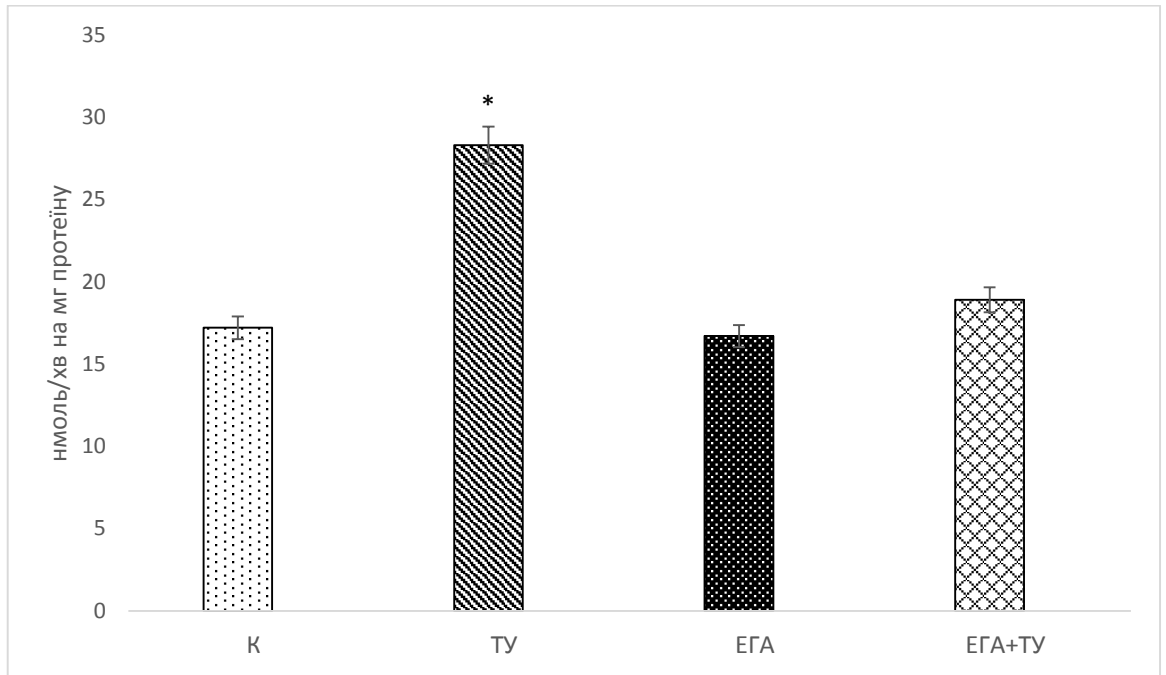


Рис. 4 Швидкість утворення гідроксильного радикалу (НО<sup>•</sup>) в мітохондріях нирок тварин за умов токсичного ураження ацетамінофену та введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre*

Відомо, що чутливою мішенню до дії АФК є ліпіди та протеїни. Маркером окислювального uszkodження ліпідів є ТБК-активні продукти. ТБК-активні продукти (TBARS) – це група сполук, які утворюються внаслідок пероксидного окиснення ліпідів і реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК), утворюючи забарвлений комплекс. Вимірювання ТБК-активних продуктів є одним з найпоширеніших методів оцінки інтенсивності ліпідної пероксидації.

До ТБК-активних продуктів належать:

- малоновий діальдегід (МДА) – основний і найвідоміший маркер ліпідної пероксидації;
- альдегіди та кетони, що утворюються при розпаді поліненасичених жирних кислот (але МДА є найбільш специфічним).

Маркером окиснювального uszkodження протеїнів є карбонільні похідні. Карбонільні похідні білків – це продукти окисного uszkodження протеїнів, у

складі яких з'являються карбонільні групи ( $-C=O$ ). Вони утворюються під дією реактивних форм кисню внаслідок:

- прямого окиснення амінокислотних залишків (лізин, аргінін, пролін, треонін),
- або вторинного приєднання альдегідів, що утворюються під час ліпідної пероксидації (наприклад, МДА, 4-гідроксиноненаль).

Карбонільні похідні є одним з найбільш стабільних і широко використовуваних показників оксидативного ушкодження білків [95 – 96].

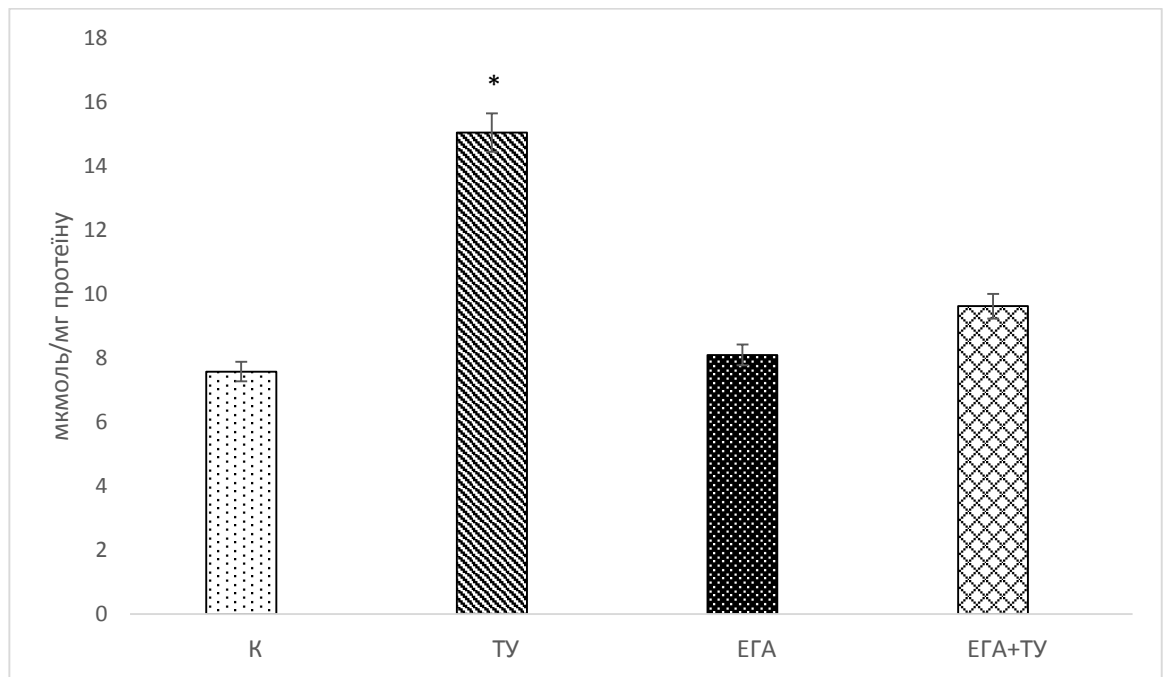


Рис. 5 Вміст ТБК-активних продуктів у мітохондріях нирок тварин за умов токсичного ураження ацетамінофену та введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre*

Проведені нами дослідження показали, що введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre* не впливає на показники функціонального стану нирок та оксидативного стресу у здорових тварин, оскільки досліджувані показники не відрізняються від значень контрольної групи. Водночас, попереднє введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre* тваринам перед моделюванням токсичного ураження ацетамінофеном проявляє протекторний ефект. Так, вміст сечовини (рис. 1) та креатиніну (рис. 2) у сироватці крові достовірно знижується порівняно з тваринами групи ТУ, проте не досягає

значень контрольної групи. Окрім того, попереднє введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre* зменшує прояви оксидативного ушкодження біомолекул мітохондрій нирок, про що свідчить наближення до показників контролю вмісту ТБК-активних продуктів (рис. 5) та карбонільних похідних (рис. 6) при одночасному зменшенні інтенсивності утворення супероксидного (рис. 3) та гідроксильного радикалів (рис. 4).

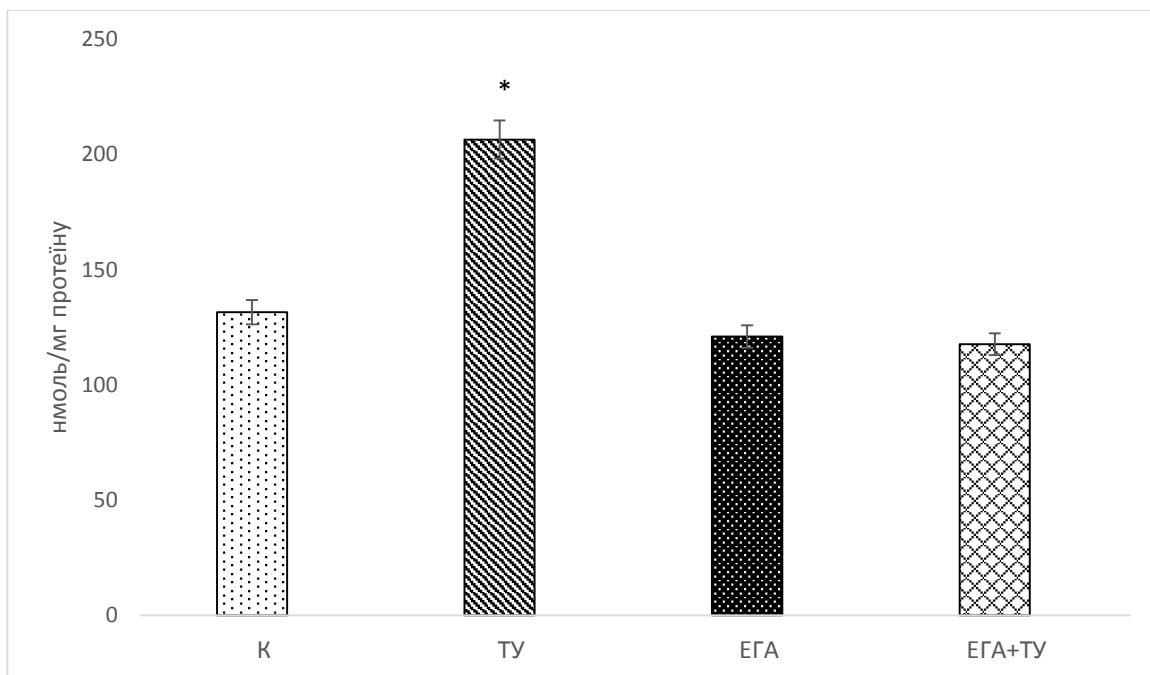


Рис. 6 Вміст карбонільних похідних у мітохондріях нирок тварин за умов токсичного ураження ацетамінофену та введення етанольного екстракту гриба *H. alpestre*

Аналіз гістологічного зрізу нирок тварин контрольної групи показав, що паренхіма нирки збережена, представлена нирковими тільцями, прямими та звивистими проксимальними і дистальними канальцями. Структура ниркових тілець без патологічних змін: добре виражений сечовий простір капсули Шумлянського-Боумена з помірно кровонаповненими капілярами судинного клубочка. набряку інтерстицію не виявлено. У тканині нирок зустрічаються поодинокі колабовані клубочки (рис. 7, А). Найгірша патоморфологічна картина зміни стану нирок щура характерна для тварин групи ТУ – у нирковій тканині підслідного щура майже всі клубочки колабовані, що складає більше 80 % від загальної кількості (рис. 7, Г). У тварин групи ЕГА+ТУ у

гістологічному зрізі виявлена значна частка колабованих клубочків, їх вміст складає близько 20% (рис. 7, Б).

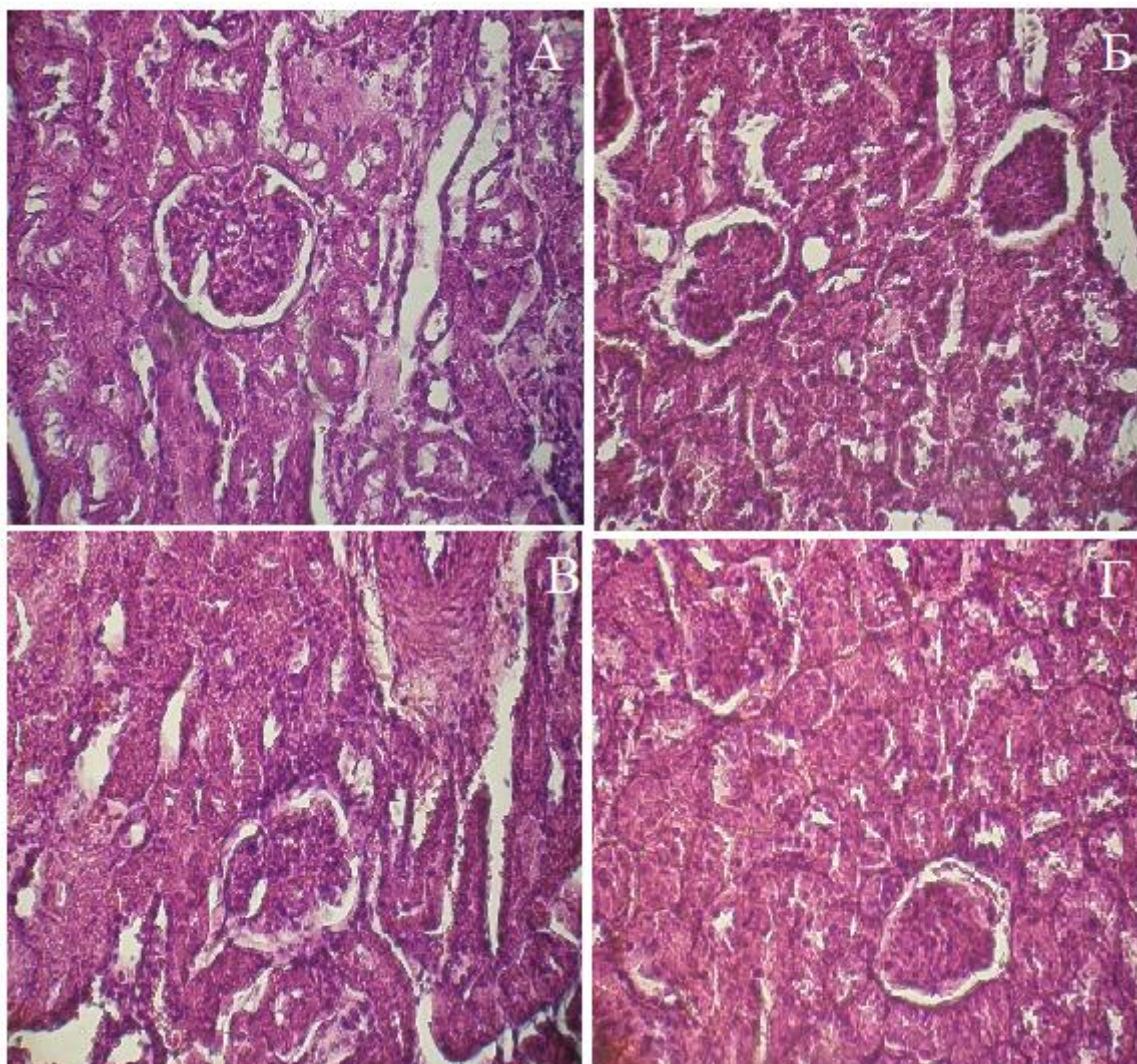


Рис. 7. Мікрофотографії гістологічного зрізу нирки (зabarвлення гематоксиліном і еозином, 100×)

Отримані результати свідчать, попереднє введення екстракту гриба *H. alpestre* виявляє значний захисний ефект на нирки тварин. Проведене дослідження підтверджує актуальність використання природних сполук, зокрема екстракту гриба *Hericium alpestre*, як джерела нових нефропротекторних агентів для протидії токсичному ураженню нирок. Експериментальна модель довела, що токсичність ацетамінофену для нирок пов'язана із мітохондріальним оксидативним стресом, що призводить до функціональної недостатності (азотемії) та масивного структурного ушкодження нирок.

Етанольний екстракт *Hericium alpestre* зменшує прояви токсичного ураження ацетамінофеном. Його введення дозволяє пригнічувати надмірне продукування АФК у мітохондріях і запобігати окисному ушкодженню ліпідів та білків. Цей біохімічний захист ефективно запобігає функціональним і морфологічним порушенням, підтверджуючи високий органопротекторний потенціал екстракту цього виду грибів.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що передозування ацетамінофеном призводить до порушення функціонального стану нирок, про що свідчить підвищення вмісту сечовини у сироватці крові у понад два рази та вмісту креатиніну майже втричі порівняно з показниками контрольної групи на тлі активації продукування активних форм кисню у мітохондріях – зокрема, трикратним збільшенням супероксиду ( $O_2^{\cdot-}$ ) та 1,5-кратним зростанням гідроксильного радикалу ( $HO^{\cdot}$ ), значного структурно-функціонального ушкодження біомолекул мітохондрій, що підтверджується зростанням ТБК-активних продуктів (пероксидація ліпідів) та карбонільних похідних (окиснення протеїнів).

2. Показано, що попереднє введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* призводить до достовірного зниження інтенсивності утворення АФК у мітохондріях нирок, пригнічення реакцій окисного ушкодження біомолекул, про що свідчить наближення до контрольних значень вмісту ТБК-активних продуктів і карбонільних похідних, а також до покращення екскреторної функції нирок (зниження рівня сечовини та креатиніну у крові).

3. Введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* забезпечує збереження архітекtonіки нирки, про що свідчить зменшення відсотка колабованих клубочків з понад 80% у токсичній групі до приблизно 20% у групі з попередньою терапією. Отримані результати свідчать, що збереження мітохондріальної функції є критичним для запобігання некрозу та структурній цілісності ниркових тілець за умов передозування ацетамінофеном.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Нирки – головний фільтр нашого організму. *Urosvit*. Режим доступу: <https://urosvit.com/nyrky-golovnyj-filtr-nashogo-organizmu/>.
2. Yaman H., Isbilir S., Cakir E., Uysal B. Current issues with paracetamol induced toxicity. *J Exp Integr Med*. 2011. Vol. 1 (3). P. 165-166.
3. Demirbag S., Uysal B., Guven A., Caysi T., Ozler M., Ozkan A., Kaldirim U., Surer I., Korkmaz A. Effects of medical ozone therapy on acetaminophen-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail*. 2010. Vol. 32 (4). P. 493-497.
4. Abdul Hamid Z., Budin S.B., Wen Jie N, Hamid A., Husain K., Mohamed J. Nephroprotective effects of Zingiber zerumbet Smith ethyl acetate extract against paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012. Vol. 13 (3). P. 176-185.
5. Aydinoz S., Uzun G., Cermik H., Atasoyu E.M., Yildiz S., Karagoz B., Evrenkaya R. Effects of different doses of hyperbaric oxygen on cisplatin-induced nephrotoxicity. *Ren Fail*. 2007. Vol. 29 (3). P. 257-263.
6. Chen N., Aleksa K., Woodland C., Rieder M., Koren G. N-Acetylcysteine prevents ifosfamide-induced nephrotoxicity in rats. *Br J Pharmacol*. 2008. Vol. 153 (7). P. 1364-1372.
7. Ueki M., Ueno M., Morishita J., Maekawa N. Curcumin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation in mice. *J Bioscience Bioengineering*. 2012. Vol. 115 (5). P. 547-551.
8. Zhao Y.L, Zhou G.D, Yang H.B., Wang J.B., Shan L.M., Li R.S., Xiao X.H. Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Food Chem Toxicol*. 2011. Vol. 49 (8). P. 1705-1710.
9. Shao Q.H., Yin X.D., Liu H.X., Zhao B., Huang J.Q., Li Z.L. Kidney injury following ibuprofen and acetaminophen: a real-world analysis of post-marketing surveillance data. *Front Pharmacol*. 2021. doi: 10.3389/fphar.2021.750108.
10. Ahmad S.T., Arjumand W., Nafees S., Seth A., Ali N., Rashid S., Sultana S. Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in Wistar rats by abrogation

of oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Toxicol Lett.* 2012. Vol. 208 (2). P.149-161.

11. Blagodatski A., Yatsunskaya M., Mikhailova V., Tiasto V., Kagansky A., Katanaev V.L. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget.* 2018. Vol. 9 (49) P. 29259-29274.

12. Yasin H., Zahoor M., Yousaf Z., Aftab A., Sakeh N., Riaz N., Shamsheer B. Ethnopharmacological exploration of medicinal mushroom from Pakistan. *Phytomedicine.* 2019. Vol. 54. P. 43-55.

13. Yang F., Wang H., Feng G., Zhang S., Wang J., Cui L. Rapid Identification of Chemical Constituents in *Hericium erinaceus* Based on LC-MS/MS Metabolomics. *J. Food Qual.* 2021. Vol. 2021. doi: 10.1155/2021/5560626.

14. Smith H.W. The kidney: structure and function in health and disease. *New York: Oxford University Press. Inc;* 1951. РЕЖИМ ДОСТУПУ: <https://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.549484/mode/2up>.

15. Myers G.L., Miller W.G., Coresh J., Fleming J., Greenberg N., Greene T., Hostetter T., Levey A.S., Panteghini M., Welch M., Eckfeldt J.H. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem.* 2006. Vol. 52 (1). P. 5-18.

16. National Kidney Disease Education Program. *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.* 2011. РЕЖИМ ДОСТУПУ: [http://www.nkdep.nih.gov/labprofessionals/estimate\\_report\\_gfr.htm](http://www.nkdep.nih.gov/labprofessionals/estimate_report_gfr.htm).

17. Miyata T., Jadoul M., Kurokawa K., Van Ypersele de Strihou C. Beta-2 microglobulin in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998. Vol. 9 (9). P. 1723-1735.

18. Filler G., Priem F., Lepage N., Sinha P., Vollmer I., Clark H., Keely E., Matzinger M., Akbari A., Althaus H., Jung K. Beta-trace protein, cystatin C, beta (2)-microglobulin, and creatinine compared for detecting impaired glomerular filtration rates in children. *Clin Chem.* 2002. Vol. 48. No. 5. P. 729-736.

19. Donadio C. Serum and urinary markers of early impairment of GFR in chronic kidney disease patients: diagnostic accuracy of urinary beta-trace protein. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010. Vol. 299 (6). P. 1407-1423.
20. Delanghe J.R. How to estimate GFR in children. *Nephrol Dial Transplant*. 2009. Vol. 24. No. 3. P. 714-716.
21. Laterza O.F., Price C.P., Scott M.G. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate. *Clin Chem*. 2002. Vol. 48. (5). P. 699-707.
22. Filler G., Bokenkamp A., Hofmann W., Le Bricon T., Martinez-Bru C., Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR—history, indications, and future research. *Clin Biochem*. 2005. Vol. 38 (1). P. 1-8.
23. Herget-Rosenthal S., Bokenkamp A., Hofmann W. How to estimate GFR—serum creatinine, serum cystatin C or equations? *Clin Biochem*. 2007. Vol. 40 (3-4). P. 153-161.
24. Shlipak M.G., Sarnak M.J., Katz R., Fried L.F., Seliger S.L., Newman A.B., Siskovick D.S., Stehman-Breen C. et al. Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *N Engl J Med*. 2005 Vol. 352. No. 20. P. 2049-2060.
25. Herget-Rosenthal S., Marggraf G., Husing J., Goring F., Pietruck F., Janssen O., Philipp T., Kribben A. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*. 2004. Vol. 66 (3). P. 1115-1122.
26. Nejat M., Pickering J.W., Walker R.J., Endre Z.H. Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant*. 2010. Vol.25. No. 10. P. 3283-3289.
27. Bokenkamp A., Franke I., Schlieber M., Duker G., Schmitt J., Buderus S., Lentze M.J., Stoffel-Wagner B. Beta-trace protein—a marker of kidney function in children: “Original research communication-clinical investigation”. *Clin Biochem*. 2007. Vol. 40. (13-14). P. 969-975.
28. Vynckier L.L., Flore K.M.J., Delanghe S.E., Delanghe J.R. Urinary beta-trace protein as a new renal tubular marker. *Clin Chem*. 2009. Vol. 55 (6). P. 1241-1243.

29. Spanaus K.S., Kollerits B., Ritz E., Hersberger M., Kronenberg F., von Eckardstein A. Serum creatinine, cystatin C, and beta-trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Chem*. 2010. Vol. 56 (5). P. 740-749.

30. Israni A.K., Kasiske B.L. Laboratory assessment of kidney disease: clearance, urinalysis, and kidney biopsy. *Brenner and Rector's the kidney*. 2008. Vol. 1. P. 724-756.

31. Lai M.W., Klein-Schqartz W., Rodgers G.C., Abrams J.Y., Haber D.A., Bronstein A.C., Wruk K.M. 2005 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' national poisoning and exposure database. *Clin Toxicol (Phila)*. 2006. Vol. 44 (6-7). P. 803-932.

32. Boutis, K., Shannon M. Nephrotoxicity after acute severe acetaminophen poisoning in adolescents. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2001. Vol. 39 (5). P. 441-445.

33. Larson A.M., Polson J., Fontana R.J., Devern T.J., Lalani E., Hynan I.S., Reisch J.S., Schiodt F.V., Ostapowicz G., Shakil A.O., Lee W.M. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter prospective study. *Hepatology*. 2005. Vol. 42 (6). 1364-1372.

34. Gu J., Cui H., Behr M., Zhang L., Zhang Q.Y., Yang W., Hinson J.A., Ding X. In vivo mechanisms of tissue-selective drug toxicity: effects of liver-specific knockout of the NADPH-cytochrome P-450 reductase gene on acetaminophen toxicity in kidney, lung, and nasal mucosa. *Mol Pharmacol*. 2005. Vol. 67 (3). P. 623-630.

35. Bessems J.G., Vermeulen N.P. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues, and protective approaches. *Crit Rev Toxicol*. 2001. Vol. 31 (1). P. 55-138.

36. Khandkar M.A., Parmar D.V., Das M., Katyare S.S. Is activation of lysosomal enzymes responsible for paracetamol-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity? *J Pharm Pharmacol*. 1996. Vol. 48 (4). P. 437-440.

37. Lorz C., Justo P., Sans A.B., Egido J., Ortiz A. Role of Bcl-xL in paracetamol-induced tubular epithelial cell death. *Kidney Int.* 2005. Vol. 67 (2). P. 592-601.
38. Bray G.P., Harrison P.M., O'Grady J.G., Tredger J.M., Williams R. Long-term anticonvulsant therapy worsens outcome in paracetamol-induced fulminant hepatic failure. *Hum Exp Toxicol.* 1992;. Vol. 11 (4). P. 265-270.
39. Hu J.J., Lee M.J., Vapiwala M., Reuhl K., Thomas P.E., Yang C.S. Sex-related differences in mouse renal metabolism and toxicity of acetaminophen. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993. Vol. 122 (1). P. 16-26.
40. Hoivek D.J., Fischer R.L., Brendel K., Gandolfi A.J., Khairallah E.A., Cohen S.D. Protein arylation precedes acetaminophen toxicity in a dynamic organ slice culture of mouse kidney. *Fundam Appl Toxicol.* 1996. Vol. 34 (1). P. 99-104.
41. Eguia L., Materson B.J. Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy.* 1997. Vol. 17 (2). P. 363-370.
42. Mour G., Feinfeld D.A., Caraccio T., McGuigan M. Acute renal dysfunction in acetaminophen poisoning. *Ren Fail.* 2005. Vol. 27 (4). P. 381-383.
43. Stern S.T., Bruno M.K., Hennig G.E., Horton R.A., Roberts J.C., Cohen S.D. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice: I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005. Vol. 202 (2). P. 151-159.
44. Mugford C.A., Tarloff J.B. The contribution of oxidation and deacetylation to acetaminophen nephrotoxicity in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett.* 1997. Vol. 93 (1). P. 15-22.
45. Bjorck S., Svalander D.T., Aurell M. Acute renal failure after analgesic drugs including paracetamol (acetaminophen). *Nephron.* 1988 Vol. 49 (1). P. 45-53.
46. Kleinman J.G., Breitenfeld R.V., Roth D.A. Acute renal failure associated with acetaminophen ingestion: report of a case and review of the literature. *Clin Nephrol.* 1980. Vol. 14 (4). P. 201-205.
47. Von Mach M.A., Hermanns-Clausen M., Koch I., Hengstler J.G., Lauterbach M., Kaes J., Weilemann L.S. Experiences of a poison center network

with renal insufficiency in acetaminophen overdose: an analysis of 17 cases. *Clin Toxicol (Phila)*. 2005. Vol. 43 (1). P. 31-37.

48. Kawagishi H., Shimada A., Shirai R., Okamoto K., Ojima F., Sakamoto H., Ishiguro Y., Furukawa S. Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett*. 1994. Vol. 35 (10). P. 1569-1572.

49. Saito Y., Nishide A., Kikushima K., Shimizu K., Ohnuki K. Improvement of cognitive functions by oral intake of *Herichium erinaceus*. *Biomed Res*. 2019. Vol. 40 (4). P.125-131.

50. Mori K., Inatomi S., Ouchi K., Azumi Y., Tsuchida T. Improving effects of the mushroom Yamabushitake (*Herichium erinaceus*) on mild cognitive impairment: A double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytother Res*. 2009. Vol. 23 (3). P. 367-372.

51. Li I.C., Chen Y.L., Lee L.Y., Chen W.P., Tsai Y.T., Chen C.C., Chen C.S. Evaluation of the toxicological safety of erinacine A-enriched *Herichium erinaceus* in a 28-day oral feeding study in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol*. 2014. Vol. 70. P. 61-67.

52. Thongbai B., Rapior S., Hyde K.D., Wittstein K., Stadler M. *Herichium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom. *Mycological Progress*. 2015. Vol. 14 (91). P. 1-23.

53. Chen S.N., Chang C.S., Yang M.F., Chen S., Soni M., Mahadevan B. Subchronic toxicity and genotoxicity studies of *Herichium erinaceus*  $\beta$ -glucan extract preparation. *Curr Res. Toxicol*. 2022. Vol. 3 (3). doi: 10.1016/j.crttox.2022.100068.

54. Li I.C., Chen Y.L., Chen W.P., Lee L.Y., Tsai Y.T., Chen C.C., Chen C.S. Genotoxicity profile of erinacine A-enriched *Herichium erinaceus* mycelium. *Toxicol Rep*. 2014. Vol. 1. P. 1195-1201.

55. Li I.-C., Chang H.-H., Lin C.-H., Chen W.-P., Lu T.-H., Lee L.-Y., Chen Y.-W., Chen Y.-P., Chen C.-C., Lin D.P.-C. Prevention of Early Alzheimer's Disease by Erinacine A-Enriched *Herichium erinaceus* Mycelia Pilot Double-Blind

Placebo-Controlled Study. *Front Aging Neurosci.* 2020. Vol. 12. No. 155. doi: 10.3389/fnagi.2020.00155.

56. Friedman M. Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Herichium erinaceus* (Lion's Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds. *J Agric Food Chem.* 2015. Vol. 63 (32). P. 7108-7123.

57. Guan Y., Shi D., Wang S., Sun Y., Song W., Liu S., Wang C. *Herichium coralloides* Ameliorates Alzheimer's Disease Pathologies and Cognitive Disorders by Activating Nrf2 Signaling and Regulating Gut Microbiota. *Nutrients.* 2023. Vol. 15 (17). P. 3799.

58. Heleno S.A., Barros L., Martins A., Queiroz M.J.R.P., Morales P., Fernández-Ruiz V., Ferreira I.C.F.R. Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Herichium* wild edible species. *LWT - Food Sci. Technol.* 2015. Vol. 63 (1). P. 475-481.

59. Cohen N., Cohen J., Asatiani M.D., Varshney V.K., Yu H.T., Yang Y.C., Li Y.H., Mau J.L., Wasser S.P. Chemical Composition and Nutritional and Medicinal Value of Fruit Bodies and Submerged Cultured Mycelia of Culinary-Medicinal Higher Basidiomycetes Mushrooms. *Int J Med Mushrooms.* 2014. Vol. 16 (3). P. 273-291.

60. Yang F., Wang H., Feng G., Zhang S., Wang J., Cui L. Rapid Identification of Chemical Constituents in *Herichium erinaceus* Based on LC-MS/MS Metabolomics. *J Food Qual.* 2021. Vol. 2021 (3). P. 1-10.

61. Li H., Zhang Q. Research Progress of Flavonoids Regulating Endothelial Function. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023. Vol. 16 (9). P.1201.

62. Hasnat H., Shompa S.A., Islam M.M., Alam S., Richi F.T., Emon N.U., Ashrafi S., Ahmed N.U., Chowdhury M.N.R., Fatema N., et al. Flavonoids: A treasure house of prospective pharmacological potentials. *Heliyon.* 2024. Vol. 10 (6). e. 27533.

63. Hao B., Yang Z., Liu H., Liu Y., Wang S. Advances in Flavonoid Research: Sources, Biological Activities, and Developmental Prospectives. *Curr. Issues Mol Biol.* 2024. Vol. 46 (4). P. 2884-2925.
64. Chong P.S., Fung M.-L., Wong K.H., Lim L.W. Therapeutic Potential of *Herichium erinaceus* for Depressive Disorder. *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 21 (1). doi: 10.3390/ijms21010163.
65. Qi J., Wu J., Kang S., Gao J., Kawagishi H., Liu H., Liu C. The chemical structures, biosynthesis, and biological activities of secondary metabolites from the culinary-medicinal mushrooms of the genus *Herichium*: A review. *Chin J Nat Med.* 2024. Vol. 22 (8). P. 676-698.
66. Kobayashi S. Total Synthesis of Geranyl-Resorcinols Isolated from Mushrooms of Genus *Herichium*. *Synthesis.* 2023. Vol. 55 P. 417-432.
67. Mai Huong L., Huu Nghi D., Dinh Luyen N., Thu Quynh D., Huong P.T.T., Tai B.H., Kiem P.V. *Herichium* VN, an undescribed compound isolated from *Herichium erinaceus* and its cytotoxic activity on human brain astrocytoma. *J Asian Nat Prod Res.* 2024. Vol. 26 (7). P. 850-857.
68. Wang M., Gao Y., Xu D., Konishi T., Gao Q. *Herichium erinaceus* (Yamabushitake): a unique resource for developing functional foods and medicines. *Food Funct.* 2014. Vol. 5 (12). P. 3055-3064.
69. Tan Y.F., Mo J.S., Wang Y.K., Zhang W., Jiang Y.P., Xu K.P., Tan G.S., Liu S., Li J., Wang W.X. The ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of the genus *Herichium*. *J Ethnopharmacol.* 2024. Vol. 319 (Pt 3). P. 117353.
70. Zhang F., Lv H., Zhang X. Erinacerins, Novel Glioma Inhibitors from *Herichium erinaceus*, induce apoptosis of U87 cells through Bax/Capase-2 pathway. *Anticancer Agents Med Chem.* 2020. Vol. 20 (17). P. 2082-2088.
71. Lee K.F., Chen J.H., Teng C.C., Shen C.H., Hsieh M.C., Lu C.C., Lee K.C., Lee L.Y., Chen W.P., Chen C.C., Huang W.S, Kuo H.C. Protective effects of *Herichium erinaceus* mycelium and its isolated erinacine A against ischemia-

injury-induced neuronal cell death via the inhibition of iNOS/p38 MAPK and nitrotyrosine. *Int J Mol Sci.* 2014. Vol. 15 (9). P. 15073-15089.

72. Tsai-Teng T., Chin-Chu C., Li-Ya L., Wan-Ping C., Chung-Kuang L., Chien-Chang S., Chi-Ying H.F., Chien-Chih C., Shiao Y.-J. Erinacine A-enriched *Herichium erinaceus* mycelium ameliorates Alzheimer's disease-related pathologies in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice. *J Biomed Sci.* 2016. Vol. 23 (1). doi: 10.1186/s12929-016-0266-z.

73. Lee K.-F., Tung S.-Y., Teng C.-C., Shen C.-H., Hsieh M.C., Huang C.-Y., Lee K.-C., Lee L.-Y., Chen W.-P., Chen C.-C., et al. Post-Treatment with Erinacine A, a Derived Diterpenoid of *H. erinaceus*, Attenuates Neurotoxicity in MPTP Model of Parkinson's Disease. *Antioxidants (Basel).* 2020. Vol. 9 (2). doi: 10.3390/antiox9020137.

74. Rupcic Z., Rascher M., Kanaki S., Köster R.W., Stadler M., Wittstein K. Two New Cyathane Diterpenoids from Mycelial Cultures of the Medicinal Mushroom *Herichium erinaceus* and the Rare Species, *Herichium flagellum*. *Int J Mol Sci.* 2018. Vol. 19 (3). doi: 10.3390/ijms19030740.

75. Li L.N., Wang L., Guo X.L. Chemical constituents from the culture of the fungus *Herichium alpestre*. *J Asian Nat Prod Res.* 2019. Vol. 21 (8). P. 735-741.

76. Li L.N., Wang L., Cheng Y.N., Cao Z.Q., Zhang X.K., Guo X.L. Discovery and Characterization of 4-Hydroxy-2-pyridone Derivative Sambutoxin as a Potent and Promising Anticancer Drug Candidate: Activity and Molecular Mechanism. *Mol Pharm.* 2018. Vol. 15 (11). P. 4898-4911.

77. Zhang, C., Li J., Hu C., Wang J., Zhang J., Ren Z., Song X., Jia L. Antihyperglycaemic and organic protective effects on pancreas, liver and kidney by polysaccharides from *Herichium erinaceus* SG-02 in streptozotocin-induced diabetic mice. *Sci Rep.* 2017. Vol. 7 (1). doi: 10.1038/s41598-017-11457-w.

78. Wang X.Y., Zhang D.D., Yin J.Y., Xie M.Y. Recent developments in *Herichium erinaceus* polysaccharides: extraction, purification, structural characteristics and biological activities. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018. Vol. 97. P. 228-237.

79. Li L.N., Wang L., Guo X.L. Chemical constituents from the culture of the fungus *Hericium alpestre*. *J of Asian Nat Prod Res.* 2019. Vol. 21 (8). P. 735-741.
80. Kvasnytska O.B., Gozhenko A.I., Zhukov W.A. Urea: modern concepts about metabolism and physiological role in the human body. *Actual problems of transport medicine.* 2024. Vol. 2 (76). P. 35-44. doi: 10.5281/zenodo. 10888539.
81. Gozhenko A.I., Korda M.M., Smaglyi V.S., Badiuk N.S., Zukow W.A., Klishch I.M., Korda I.V., Bovbushkar I.S., Popovych I.I. Uric acid, metabolism, neuro-endocrine-immune complex: a monograph. Odesa: Feniks; 2023. P. 266. doi: 10.5281/zenodo. 7575158.
82. Bombushkar I., Gozhenko A., Korda I., Badiuk N., Zukow W., Popovych I. Features of the exchange of electrolytes and nitrogenous metabolites under different options of uric acid exchange in healthy female rats. *J Educ Health Sport.* 2020. Vol. 10 (4). P. 405-415.
83. Korda M.M., Gozhenko A.I, Popovych I.L., Klishch I.M., Bombushkar I. S., Korda I.V., Badiuk N.S., Zukow W.A., Smaglyi V.S., Horbachevsky I. Neurotropic, hormonal and immunotropic activity of uric acid: a monograph. Ternopil National Medical University. Ternopil: Ukrmedknyga. 2024. P. 206. doi: 10.5281/ zenodo. 10990426.
84. Levey A.S., Inker L.A. Assessment of Glomerular Filtration Rate in Health and Disease: A State of the Art Review. *Clin Pharmacol Ther.* 2017. Vol. 102 (3). P. 405-419.
85. Dodge W.F., Travis L.B., Daeschner C.W. Comparison of endogenous creatinine clearance with inulin clearance. *Am J Dis Child.* 1967. Vol. 113 (6). P. 683-692.
86. Andreev E., Koopman M., Arisz L. A rise in plasma creatinine that is not a sign of renal failure: Which drugs can be responsible. *J Intern Med.* 1999. Vol.246 (3). P. 247-25.
87. Urbschat A., Obermuller N., Haferkamp A. Biomarkers of Kidney Injury. *Biomarkers.* 2011. Vol. 16. P. 22-30.

88. Levey A.S., Coresh J. Chronic kidney disease. *The Lancet*. 2012. Vol. 379. P. 165-180.
89. Kovesdy C.P. Management of hyperkalaemia in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2014. Vol. 10. P. 653-662.
90. Jaeschk H., Ramachandran A. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *J Clin Transl Res*. 2017. Vol. 3 (1). P. 157-169. doi:10.18053/jctres.03.2017S1.002
91. Hinson J.A., Roberts D.W., James L.P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Expl Pharmacol*. 2010. Vol. 196. P. 369-405.
92. Zhao Y.L., Zhou G.D., Yang H.B., Wang J.B., Shan L.M., Li R.S., Xiao X.H. Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Food Chem Toxicol*. 2011. Vol. 49 (8). P. 1705-1710.
93. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Edition, Oxford University Press, New York. 2015. Режим доступа: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
94. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007. Vol. 39 (1). P. 44-84.
95. Draper H.H., Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990. Vol. 186. P. 421-431.
96. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. Methods for measuring oxidative stress in biological samples. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005. Vol. 15 (4). P. 316-328.

## 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 стакану 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 їдкою 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 «Вогнебезпечні речовини».

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогнебезпечними 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.