

ЕНЗИМАТИЧНІ МАРКЕРИ СТАНУ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ ЕТАНОЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ ГРИБА *HERICIUM ALPESTRE* ТВАРИНАМ З ІНТОКСИКАЦІЄЮ АЦЕТАМІНОФЕНОМ

О. М. ВОЛОЩУК, І. С. ШНАЙДЕР

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: o.voloschuk@chnu.edu.ua

Роботу присвячено визначенню ензиматичних маркерів стану печінки за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*. Дослідження проводили на 4 групах тварин: I група – контрольні тварини (К); II – щури, яким вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла протягом 10 діб (ЕГА); III – тварини, яким моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном (ТУ); IV – 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 (ЕГА+ТУ). Визначено активність аланінамінотрансферази, аспаратамінотрансферази, лужної фосфатази та розраховано коефіцієнт *de Ritis* як маркерів функціонального стану печінки, за умов інтоксикації ацетамінофеном та введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*. Визначення ензиматичних активностей проводили на біохімічному аналізаторі *Biochem FC-120*. Пофарбовані гематоксиліном та еозином зрізи печінки тварин різних експериментальних груп оцінювали гістологічно. Встановлено, що попереднє введення етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* у дозі 200 мкг/кг маси тіла протягом 10 діб виявляє гепатопротекторні ефекти при ацетамінофен-індукованій токсичності, оскільки активність АлТ, АсТ і лужної фосфатази за умов введення досліджуваного екстракту достовірно знижується і наближається до рівня контрольних значень на тлі відсутності гістологічних ознак загибелі клітин печінки. Отримані результати свідчать, що гриб *H. alpestre* може розглядатися як цінне джерело біологічно активних сполук з гепатопротекторною активністю, має значний потенціал для розробки на його основі гепатопротекторних препаратів та є перспективним кандидатом для розробки нових профілактичних стратегій.

Ключові слова: ацетамінофен, етанольний екстракт *H. alpestre*, аланінамінотрансфераза, аспаратамінотрансфераза, лужна фосфатаза, гістологічний зріз

Вступ. Медикаментозне ураження печінки залишається серйозною клінічною проблемою в усьому світі (Mingzhu et al., 2018). Гепатотоксичність може виникнути при передозуванні деякими ліками, оскільки печінка відіграє важливу роль у метаболізмі медикаментозних препаратів, та при переважанні високими дозами не здатна ефективно їх знешкоджувати. Це призводить до активації запальних процесів та окиснювального стресу, що лежить в основі порушення структурно-функціональної організації печінки (Singh et al., 2024). До широрозповсюджених препаратів, що викликають гепатотоксичні ефекти, належить ацетамінофен. У терапевтичних дозах цей препарат безпечний, проте передозування ацетамінофеном може спричинити ураження печінки і навіть смерть. Симптоми печінкової токсичності можуть

включати жовтяницю, втому, нудоту, біль у животі, а у тяжких випадках – печінкову недостатність. Вирішальне значення для з'ясування патофізіології ушкоджень печінки та для оцінки нових гепатопротекторних засобів мають експериментальні моделі тварин. В експериментальних умовах часто для моделювання гепатотоксичності використовують ацетамінофен, що індукує некроз (Ezhilarasan, et al., 2024). Механізми ацетамінофен-індукованої загибелі клітин, які стосуються як тварин, так і людини, включають утворення реакційноздатного метаболіту N-ацетил-p-бензохіноніміну (NAPQI) за участі цитохрому P450 (Cyp2E1), виснаження у печінці запасів відновленого глутатіону та утворення білкових аддуктів, переважно у мітохондріях (Jaeschke, Ramachandran, 2024). Гостре ураження печінки, індуковане передозуванням ацетамінофеном,

використовується як надійна модель для оцінки гепатопротекторного ефекту нових сполук (Reddy et al., 2017).

Використання сполук природного походження як нових терапевтичних засобів для корекції гепатотоксичності є багатообіцяючим напрямком у сучасній медицині (Li et al., 2023). Зокрема, біологічно активні сполуки деяких грибів продемонстрували антиоксидантну, протизапальну та регенеруючу дію на гепатоцити, що робить їх цінними кандидатами для зменшення проявів пошкодження печінки, викликаного ліками (Sumy et al., 2014). Крім того, препарати природного походження часто мають менше побічних ефектів порівняно з синтетичними препаратами, що підвищує їх привабливість для лікування печінки (Singh et al., 2024). Особливу увагу привертають гриби роду *Hericium*, зокрема *H. alpestre*. Гриб занесений до Червоних списків деяких європейських та азійських країн, водночас інформація щодо біологічних ефектів екстрактів цього гриба практично відсутня.

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

Матеріали та методи. “Експерименти виконували на білих безпородних щурах масою 120–150 г, віком 2,5–3 міс. Умови утримання та маніпуляції, які проводили з тваринами під час експерименту, відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), а також рекомендаціям «Біоетичної експертизи доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах» (Київ, 2006). Тварин утримували в пластикових клітках з піщаною підстилкою, доступом до води *ad libitum*” (Voloshchuk, 2024).

Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи: I група – контрольні тварини (К); II – щури, яким вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла протягом 10 діб (ЕГА); III – тварини з гострим токсичним ураженням ацетамінофеном (ТУ); IV – тварини, яким перед моделюванням ацетамінофеніндукованого ураження протягом 10 діб вводили *per os* 20 % етанольний екстракт плодових тіл гриба *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла (ЕГА+ТУ). Моделювання ацетамінофеніндукованого ураження здійснювали шляхом введення *per os* ацетамінофену в дозі 1 г/кг маси

тварин у 2 %-й крохмальній суспензії протягом 2 діб через 24 год за допомогою спеціального зонда (Gao et al., 2017).

У роботі досліджений гриб *Hericium alpestre*, який був наданий національним-природничим парком “Туцільщина” у рамках договору про співпрацю з кафедрою біохімії та біотехнології ЧНУ імені Ю.Федьковича. Екстракцію проводили згідно з методом, запропонованим у роботі (Boonsong et al., 2016) з деякими змінами. Для приготування етанольного екстракту порошкоподібний зразок гриба (5 г), попередньо висушеного і подрібненого, змішували з 50 мл 70% етанолу і струшували при 150 об/хв при кімнатній температурі протягом 24 годин; потім його центрифугували при 12000 об/хв протягом 15 хв. Супернатант фільтрували за допомогою фільтрувального паперу Ватман і збирали фільтрат. Залишок повторно екстрагували за тих же умов. Отриманий екстракт концентрували під вакуумом при 40 °C на роторному випарнику Labfreez RE-2000E. Отриманий зразок зберігався в темному місці при 4 °C (Kopylchuk et al., 2023). Для подальшого дослідження гепатопротекторної активності готували 20 % екстракт *Hericium alpestre* у концентрації 200 мкг/кг маси тіла.

Ензиматичні активності аланінаміно-трансферази (АлТ), аспартатамінотрансферази (АсТ) та лужної фосфатази у сироватці крові визначали на біохімічному аналізаторі Biochem FC-120 (High Technology Inc., North Attleboro, MA, USA). Коефіцієнт де Рітиса розраховували як співвідношення активностей АсТ/АлТ.

Відібрані печінки двічі промивали холодним фосфатно-сольовим буфером, заливали 10% формальдегідом для подальшого гістопатологічного дослідження. Усі пофарбовані гематоксиліном та еозином зрізи печінки тварин різних експериментальних груп оцінювали гістологічно.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програми «Microsoft Excel». Представляли їх як середнє значення 9 незалежних визначень $\pm$ похибка середнього. Статистичну значимість різниці середніх показників оцінювали, використовуючи стандартний критерій *t* Стьюдента. Різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$ ” (Voloshchuk, 2024).

Результати та їх обговорення. Гриби на сьогодні розглядаються як потенційне джерело біологічно активних сполук, що можуть використовуватися у медичній практиці для корекції різноманітних порушень або розглядатися як кандидати для створення нових

шаблонів синтетичних ліків (Podkowa et al., 2020). Понад 25 % ліків мають природне походження або містять компоненти природного походження. Тому залишається актуальним питання пошуку природних джерел біоактивних сполук як альтернативи неселективним, токсичнішим та менш чутливішим синтетичним лікам (Hossain et al., 2023).

Результати досліджень показали, що у тварин, які отримували токсичні дози ацетамінофену, спостерігається ураження печінки. Це підтверджується значним підвищенням ензиматичної активності АлТ (рис. 1, А) та АсТ (рис. 1, Б) у сироватці крові, а також зниженням коефіцієнта де Рітиса (рис. 1, В), що розглядаються як маркери функціонального стану печінки.

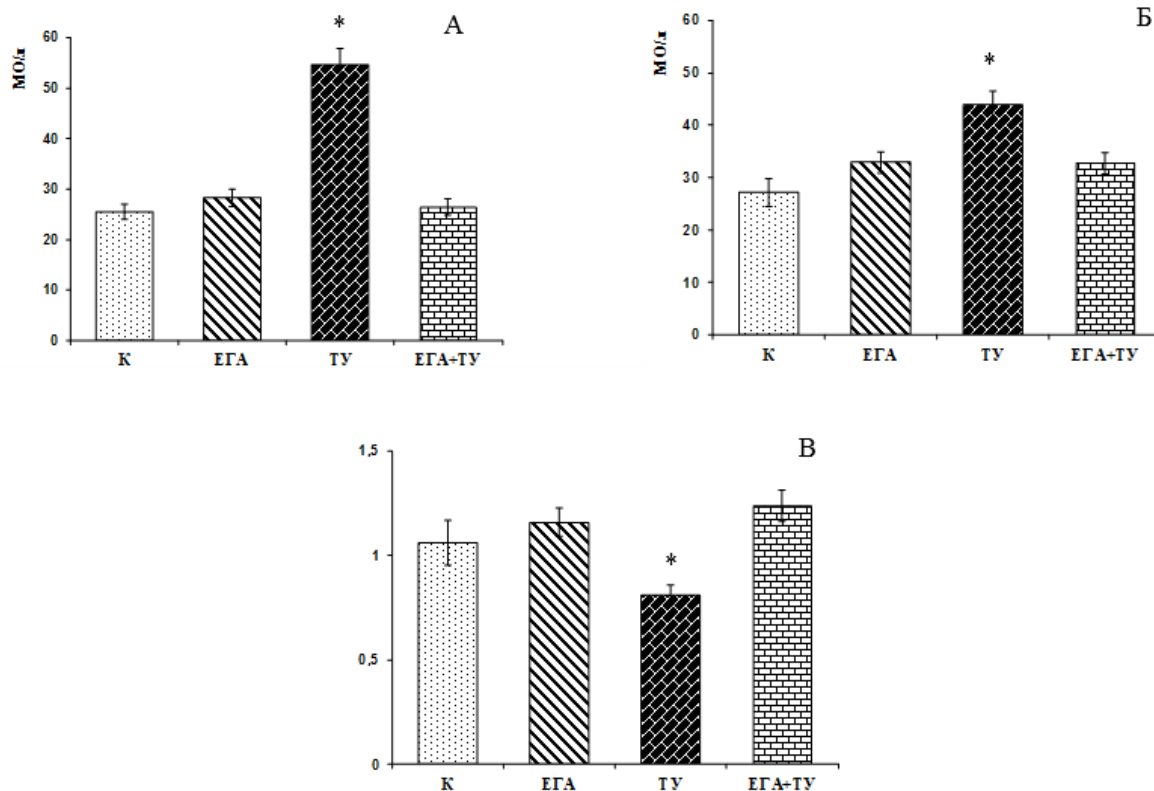


Рис. 1. Активність аланінамінотрансферази (А), аспартатамінотрансферази (Б) у сироватці крові тварин та коефіцієнт де Рітиса (В) за умов введення токсичних доз ацетамінофену та етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

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

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

Для оцінки функціональної здатності печінки традиційно визначають вміст деяких ензимів у крові, підвищений або знижений вміст яких вказує на дисфункцію печінки. АлТ і АсТ є розчинними ензимами, що локалізовані у

Fig. 1 Alanine aminotransferase (A), aspartate aminotransferase (B) activity in the blood serum of animals and de Ritis coefficient (C) under conditions of administration of toxic doses of acetaminophen and ethanolic extract of the mushroom *Hericium alpestre*

Note (hereinafter): C – control animals; EHA – rats that were administered *per os* 20% ethanolic extract of fruiting bodies of the fungus *Hericium alpestre* at a concentration of 200 $\mu\text{g/kg}$ body weight for 10 days; AII – animals with acetaminophen-induced liver injury; EHA+AII – animals that were administered *per os* 20% ethanolic extract of fruiting bodies of the fungus *Hericium alpestre* at a concentration of 200 $\mu\text{g/kg}$ body weight for 10 days before modeling acute acetaminophen-induced toxic damage;

* – significant difference with control group, $p < 0,05$

цитоплазмі гепатоцитів (Curtis, Sivilotti, 2015). При ушкодженні гепатоцитів проникність мембран підвищується, що дозволяє АлТ і АсТ потрапляти у кров, тому активність цих ензимів може вказувати на тяжкість пошкодження

гепатоцитів. Традиційно активність АлТ і АсТ у сироватці є чутливими маркерами для оцінки ураження печінки (McGill, 2016).

Окрім того, у печінці також локалізований фермент лужна фосфатаза, який відіграє вирішальну роль у виведенні фосфатних груп. Підвищений рівень лужної фосфатази може свідчити про печінкову недостатність або закупорку жовчевих проток (Jassas et al., 2023). У цьому дослідженні ми спостерігали достовірне підвищення рівня лужної фосфатази порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 2), що підтверджує формування ацетамінофен-індукованого ураження печінки. При цьому встановлене нами підвищення активності АлТ у понад 2 рази та активності лужної фосфатази лише на 30 % свідчить про гепатоцелюлярний тип пошкодження клітин у age (150 days) and mature age (360 days) with APAP lesions.

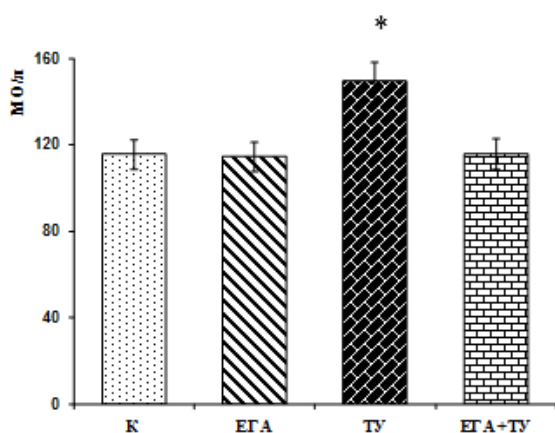


Рис. 2. Активність лужної фосфатази у сироватці крові тварин за умов введення токсичних доз ацетамінофену та етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre*

Fig. 2. Serum alkaline phosphatase activity in animals under conditions of administration of toxic doses of acetaminophen and ethanol extract of the mushroom *Hericium alpestre*

Водночас нами встановлено, що попереднє введення 20% етанольного екстракту гриба *Hericium alpestre* виявляє захисні ефекти при ацетамінофен-індукованій токсичності. Активність АлТ, АсТ і лужної фосфатази за умов введення досліджуваного екстракту достовірно знижується і наближається до рівня контрольних значень.

Аналіз гістологічного зрізу печінки показав, що для тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном характерні виражені зміни морфології печінки, зокрема виявлено оборотне набухання клітин печінки (гідропічна

вакуолізація охоплює до 74 % клітин печінки), більше виражене по периферії печінкових часточок; спостерігаються ознаки гідропічної дегенерації і некрозу, виявляються клітини з ознаками запалення (рис. 3). При цьому у тварин, які отримували етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre*, ознак ураження клітин печінки не виявлено (рис. 3). У тварин, які перед моделюванням ацетамінофен-індукованого ураження печінки протягом 10 діб отримували екстракт досліджуваного гриба, ознаки ураження печінки практично відсутні, що також підтверджує гепатопротекторну активність сполук *Hericium alpestre*.

Отже, етанольний екстракт гриба *Hericium alpestre* може зменшувати прояви токсичного пошкодження печінки, індукованого ацетамінофеном.

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

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

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що дослідження проводилося за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які можна було б витлумачити як потенційний конфлікт інтересів.

Подяки. Автори вдячні Пасайлюк М.В., заступнику директора з наукової роботи Національного природного парку "Гуцульщина", за надані для дослідження зразки плодів гриба *Hericium alpestre*.

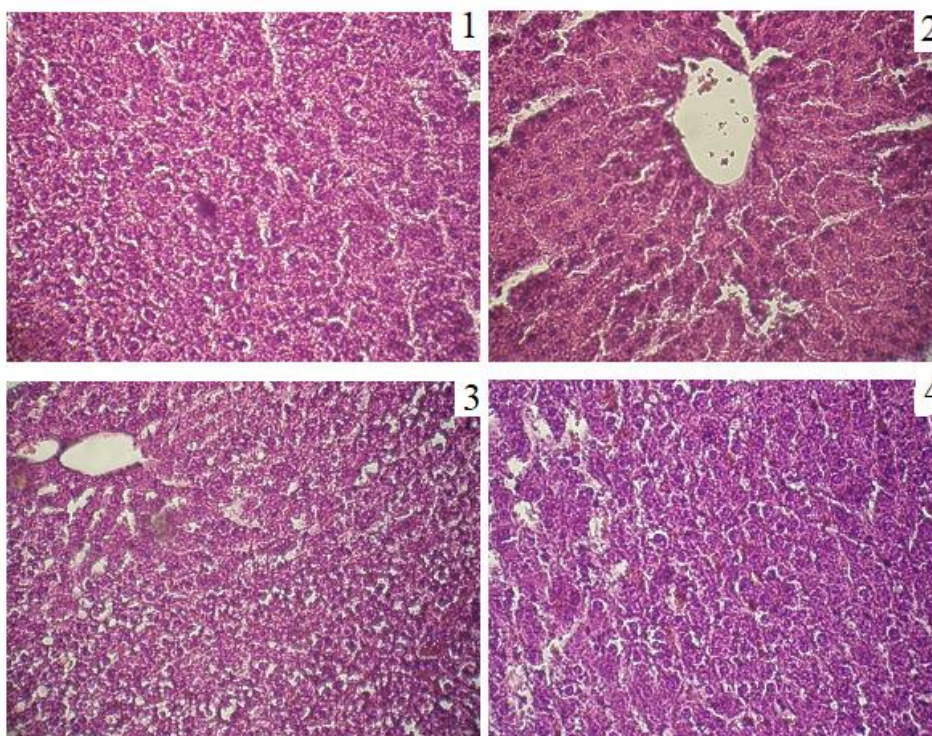


Рис. 3. Мікрофотографія гістологічного зрізу печінки (забарвлення гематоксилином і еозином, 200×)

Fig. 3. Micrograph of a histological section of the liver (hematoxylin and eosin staining, 200×)

Список використаної літератури / References:

- Boonsong, S., Wanwimol, K., Pongtep, W. (2016) Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources* 50, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.07.002>.
- Curtis, R.M., Sivilotti, M.L.A. (2015) A descriptive analysis of aspartate and alanine aminotransferase rise and fall following acetaminophen overdose. *Clin Toxicol*, 53 (9), 849-855. <https://doi.org/10.3109/15563650.2015>
- Ezhilarasan, D., Karthikeyan, S., Najimi, M., Vijayalakshmi, P., Bhavani, G., Jansi Rani, M. (2025) Preclinical liver toxicity models: Advantages, limitations and recommendations. *Toxicology*, 511, 154020. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2024.154020>
- Gao, Y., Cao, Z., Yang, X., Abdelmegeed, M.A., Sun, J., Chen, S., ... Yu, L.R. (2017) Proteomic analysis of acetaminophen-induced hepatotoxicity and identification of heme oxygenase 1 as a potential plasma biomarker of liver injury. *Proteomics Clin Appl*, 11 (1-2), 1-29. <https://doi.org/10.1002/prca.201600123>.
- Hossain, K.N., Islam, M.S., Rahman, S.H., Sarker, S., Mondal, M., Rahman, M.A., Alhag, S.K., Al-Shuraym, L.A., Alghamdi, O.A., Islam, M.T., Al-Farga, A., El-Shazly, M., Alam, M.J., El-Nashar, H.A.S. (2023) *In Vitro* Antioxidant and *In Vivo* Hepatoprotective Properties of *Wissadula periplocifolia* Extract. *ACS Omega*, 8 (49), 47001-47011. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06614>
- Jaeschke, H., Ramachandran, A. (2024) Ferroptosis and Intrinsic Drug-induced Liver Injury by Acetaminophen and Other Drugs: A Critical Evaluation and Historical Perspective. *J Clin Transl Hepatol*, 12 (12), 1057-1066. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2024.00324>
- Jassas, R.S., Naeem, N., Sadiq, A., Mehmood, R., Alenazi, N.A., Al-Rooqi, M.M., Mughal, E.U., Alsantali, R.I., Ahmed, S.A. (2023) Current status of N-,O-,S-heterocycles as potential alkaline phosphatase inhibitors: a medicinal chemistry overview. *RSC Adv*, 13 (24), 16413-16452. <https://doi.org/10.1039/d3ra01888a>
- Kopylchuk, H.P., Voloshchuk, O.M., Pasailiuk, M.V. (2023) Comparison of total amino acid compositions, total phenolic compounds, total flavonoid content, β -carotene content and hydroxyl radical scavenging activity in four wild edible mushrooms. *Italian Journal of Mycology*, 52, 112-125. <https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/16457>.
- Li, X., Lao, R., Lei, J., Chen, Y., Zhou, Q., Wang, T., Tong, Y. (2023) Natural Products for Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury: A Review. *Molecules*, 28 (23), 7901. <https://doi.org/10.3390/molecules28237901>
- McGill, M.R. (2016) The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J*, 15, 817-828. <https://doi.org/10.17179/excli2016-800>
- Podkowa, A., Kryczyk-Poprawa, A., Opoka, W., Muszynska, B. (2021) Culinary-medicinal mushrooms: a review of organic compounds and bioelements with antioxidant activity. *Eur Food Res*

- Technol, 247, 513-533.
<https://doi.org/10.1007/s00217-020-03646-1>
12. Reddy, M.K., Reddy, A.G., Kumar, B.K., Madhuri, D., Boobalan, G., Reddy, M.A. (2017) Protective effect of rutin in comparison to silymarin against induced hepatotoxicity in rats. *Vet World*, 10 (1), 74-80. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.74-80>
 13. Singh, H., Singh, T., Singh, V., Singh, B., Kaur, S., Ahmad, S.F., Al-Mazroua H.A., Singh, B. (2024) *Ehretia laevis* mitigates paracetamol-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress and inflammation in rats. *Int Immunopharmacol*, 143 (3), 113565. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113565>
 14. Sumy, A.K., Jahan, N., Sultana, N., Sikder, A.M. (2014) Effect of Oyster mushroom in Paracetamol Induced Toxicity of Liver in Wistar albino Rats. *Journal of Enam Medical College*, 4 (3), 161-167. <https://doi.org/10.3329/jemc.v4i3.20945>
 15. Yan, M., Huo, Y., Yin, S., Hu, H. (2018) Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biology*, 17, 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.019>
 16. Voloshchuk O.M. (2024) Characteristics of immunoreactivity in the rat under conditions of toxic injury with acetaminophen. *Biological systems*, 16 (1), 24-30. <https://doi.org/10.31861/biosystems2024.01.024>

ENZYMATIC MARKERS OF LIVER STATUS UNDER THE CONDITION OF ADMINISTRATION OF ETHANOL EXTRACT OF THE MUSHROOM *HERICIAM ALPESTRE* TO ANIMALS WITH ACETAMINOPHEN INTOXICATION

O. M. Voloshchuk, I. S. Schneider

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
 Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
 e-mail: o.voloshchuk@chnu.edu.ua

*The work is devoted to the determination of enzymatic markers of liver status under conditions of acetaminophen intoxication and administration of ethanol extract of the mushroom *Hericiam alpestre*. The study was conducted on 4 groups of animals: C – control animals; EHA – rats that were administered per os 20% ethanolic extract of fruiting bodies of the fungus *Hericiam alpestre* at a concentration of 200 µg/kg body weight for 10 days; AII – animals with acetaminophen-induced liver injury; EHA+ AII – animals that were administered per os 20% ethanolic extract of fruiting bodies of the fungus *Hericiam alpestre* at a concentration of 200 µg/kg body weight for 10 days before modeling acute acetaminophen-induced toxic damage. The activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase was determined, and the de Ritis coefficient was calculated as markers of the functional state of the liver, under the conditions of acetaminophen intoxication and the administration of ethanolic extract of the mushroom *Hericiam alpestre*. The determination of enzymatic activities was carried out on a biochemical analyzer, Biochem FC-120. Liver sections of animals of different experimental groups stained with hematoxylin and eosin were evaluated histologically. It was established that the preliminary administration of ethanolic extract of the mushroom *Hericiam alpestre* at a dose of 200 µg/kg of body weight for 10 days exhibits hepatoprotective effects in acetaminophen-induced toxicity, since the activity of ALT, AST and alkaline phosphatase under the conditions of the administration of the studied extract significantly decreases and approaches the level of control values against the background of the absence of histological signs of liver cell death. The obtained results indicate that the mushroom *H. alpestre* can be considered as a valuable source of biologically active compounds with hepatoprotective activity, has significant potential for the development of hepatoprotective drugs based on it, and is a promising candidate for the development of new preventive strategies.*

*Keywords: acetaminophen, ethanol extract of *H. alpestre*, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, histological section*

Отримано редколегією 15.04.2025 р.

ORCID ID

Оксана Волощук: <https://orcid.org/0000-0002-6005-3732>