

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

Фармацевтичний факультет
Кафедра медичної біохімії

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
медичної біохімії

С.Р. Підручна

«___» _____ 202_ р.

УДК 577.122.8:616-099: 582.284.5]-085.322:582.991

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

На тему: **КОРЕКЦІЯ РОЗТОРОПШОЮ ПОРУШЕНЬ БІЛКОВОГО
ОБМІНУ ПРИ УРАЖЕННІ БІЛДОЮ ПОГАНКОЮ**

Виконала здобувачка вищої освіти 5 курсу
заочної форми навчання
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація

Ілона Хороновська

Науковий керівник:
кандидат біологічних наук, доцент
доцент кафедри медичної біохімії

Ірина Кузьмак

ТЕРНОПІЛЬ 2024

ЗМІСТ

	стор.
Перелік умовних позначень	4
Вступ	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Сучасні уявлення про біохімічні механізми токсичного впливу отрути блідої поганки та патогенез отруєнь грибами	9
1.1.1 Поширення отруєнь грибами	9
1.1.2 Характеристика хімічного складу отрути блідої поганки	10
1.1.3 Токсичний ефект та механізм впливу на організм отрути блідої поганки	13
1.1.4 Застосування ліків на основі розторопші плямистої для лікування та корекції токсичного впливу на організм отрути блідої поганки	17
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	21
2.1. Відбір тварин для дослідження	21
2.2. Дослідження показників білкового обміну	22
2.2.1. Методика визначення концентрації загального білка	22
2.2.2. Визначення фракцій білків сироватки крові методом електрофоретичного розділення на агарозі	22
2.2.3. Методика визначення сечовини	22
2.2.4. Визначення концентрації креатиніну у сироватці крові	23
2.3. Дослідження протеїназо-інгібіторної системи	23
2.3.1. Визначення загальної протеолітичної активності плазми крові	23
2.3.2. Визначення вмісту α_2 – М в сироватці крові	24
2.3.3. Визначення вмісту α_1 – інгібітора протеаз в сироватці крові	25
2.4. Методи дослідження стану плазматичних мембран	

2.4.1	Визначення активності аланінамінотрансферази	26
2.4.2	Визначення активності аспартатамінотрансферази	26
2.5	Методи математичного аналізу	27
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ		28
3.1.	Токсичність отрути блідої поганки	29
3.2	Клінічні прояви введення отрути блідої поганки	31
3.4	Особливості порушення білкового обміну у щурів за умов гострого отруєння блідою поганкою	32
3.4.1	Особливості білкового складу крові при аманіта-фалоїдиновому отруєнні у тварин	32
3.4.2	Стан протеїназо-інгібіторної системи у тварин з аманіта-фалоїдиновим отруєнням	36
3.4.3.	Стан плазматичних мембран гепатоцитів у щурів	41
3.4.4.	Стан детоксикаційної функції печінки з аманіта-фалоїдиною інтоксикацією	44
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ		
Висновки		
Список використаних джерел		

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АлАТ – аланінамінотрансфераза;

АсАТ – аспартатамінотрансфераза;

БП – бліда поганка;

ум.од. – умовні одиниці;

α_1 -ІІ – α_1 - інгібітор протеїназ;

α_2 -М – α_2 - макроглобулін

ВСТУП

Актуальність теми.

Особливої актуальності, в аспекті загрози незадовільного результату захворювання та збільшення числа отруєнь, набувають випадки гострих отруєнь аманітальними грибами, до яких відносять бліду поганку *Amanita phalloides* (БП). Рівень летальності серед даних отруєнь в останні роки, навіть на фоні сучасного лікування, іноді сягає 90–95 % [1].

Amanita phalloides містить три токсини: віротоксини, фалотоксини та аматоксини. Вважається, що аматоксини відповідають за більшість токсичних ефектів. Аматоксини є термостабільними, добре розчинними у воді, стійкими до розкладання кислотою та мають високу біодоступність [5, 6, 7, 8]. Інгібування РНК-полімерази II вважається основним механізмом токсичності, що призводить до пригнічення синтезу білка та подальшої токсичності для печінки [7]. Інші механізми, такі як утворення активних форм кисню, каспаза-3-залежний апоптоз і підвищення регуляції фактора некрозу пухлини- α , також можуть бути залучені.

На основі проведеного аналізу вітчизняних та доступних зарубіжних публікацій було встановлено, що у науковій літературі наведено багато інформації щодо дослідження вуглеводного, енергетичного, ліпідного обміну [5, 37], а також вивчення механізмів токсичної дії отрути БП на живі істоти [25, 38,], але відносно порушень білкового обміну та його корекції екстрактом розторопші існує невелика кількість даних.

Тому, необхідність експериментального вивчення метаболічних порушень, зокрема білкового обміну, за умов ураження токсинами БП у різні терміни токсичного гепатиту в експерименті з подальшою корекцією екстрактом розторопші є актуальною проблемою, яка вимагає поглибленого різностороннього вивчення.

Мета роботи та завдання дослідження. Дослідити особливості порушень деяких показників білкового обміну в щурів, уражених токсинами блідої поганки в динаміці з подальшою корекцією екстрактом розторопші.

Відповідно до мети роботи, визначено такі основні **завдання**:

- дослідити особливості вмісту загального білка і співвідношення білкових фракцій сироватки крові тварин, уражених токсинами БП;
- оцінити вплив токсинів БП на стан плазматичних мембран гепатоцитів у щурів;
- з'ясувати вплив аманіта-фалоїдинових токсинів на процеси взаємодії із субстратом протеїназ організму білих щурів і встановити ланки, які найбільш чутливі до їх дії.

Об'єкт дослідження – гостре отруєння токсинами аманіта-фалоїдинового ряду у щурів в експерименті.

Предмет дослідження – показники білкового обміну організму тварин з токсичним ураженням БП.

Методи дослідження: біохімічні (колориметричні, спектрофотометричні, електрофоретичні), клінічні, статистичні (метод варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведено комплексне дослідження та дано інтегральну оцінку окремих показників білкового обміну у щурів, уражених токсинами БП з подальшою корекцією екстрактом розторопші.

Встановлено, що гостре отруєння токсинами БП призводить до виражених порушень білоксинтезувальної функції печінки і розвитку диспротеїнемії, що проявляється гіпопротеїнемією, гіпоальбумінемією, порушенням співвідношення білкових фракцій. При аманіта-фаллоїдиновому ураженні печінки зменшується відсоткове співвідношення α_1 - і α_2 -глобулінів та збільшуються фракції β - і γ -глобулінів. Доведено, що гостра аманіта-фалоїдинова інтоксикація спричиняє підвищення катаболізму білків з

порушенням знешкодження кінцевих продуктів, зростання протеолітичної активності крові й фазові зміни інгібіторного потенціалу крові, а також порушення проникності мембран гепатоцитів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані експериментальні дані дозволяють розширити існуючі уявлення про патогенетичні механізми порушення гомеостазу організму, які лежать в основі гострого отруєння БП. Дані результати можуть бути використані для розробки методів цілеспрямованої корекції патологічних змін, що виникають при отруєнні БП. Показана доцільність дослідження ряду показників білкового обміну, які дають більш детальну інформацію про глибину деструктивних процесів у гепатоцитах і ефективність лікувальних заходів. Показана ефективність застосування екстракту розторопші, який значною мірою сприяє нормалізації функціональних показників гомеостазу організму, отруєного БП.

Особистий внесок здобувача вищої освіти. Здобувачка самостійно здійснила інформаційний пошук, проаналізувала джерела літератури, встановила актуальність і ступінь вивчення проблеми, опанувала необхідні методи дослідження і виконала запланований об'єм експериментів на тваринах. Спільно з науковим керівником сформулювала мету і завдання дослідження, основні положення і висновки. Облік, статистичний аналіз, інтерпретацію отриманих результатів та написання всіх розділів дисертації здійснила особисто. Інтерпретацію одержаних результатів, висновків здійснено разом з науковим керівником – доц. Кузьмак І.П.

Публікації. За результатами кваліфікаційної роботи опубліковано тези у збірнику XXVIII Конгресу студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (присвячений 170-літтю з дня народження І.Я. Горбачевського), 8 – 10 квітня 2024 року.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційну роботу викладено на 64 сторінках комп'ютерного тексту, вона складається зі вступу,

огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, розділу власних досліджень, обговорення, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних літературних джерел (усього 49 найменувань). Роботу проілюстровано 8 таблицями та 6 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні уявлення про біохімічні механізми токсичного впливу отрути блідої поганки та патогенез отруєнь грибами

1.1.1 Поширення отруєнь грибами.

Статистика свідчить, що в нашій країні щорічно відмічаються сотні отруєнь грибами, з яких до 10-15 % закінчуються летально. Так, за даними Державної установи «Центр громадського здоров'я МОЗ України» у 2023 році в Україні зареєстровано 50 осередків отруєнь грибами з 72 постраждалими, у тому числі 15 дітей, померли 5 дорослих. У 2022 році зареєстровано 8 осередків отруєння грибами, 10 постраждалих, в тому числі 2 дитини, померли 3 людини – 2 дорослих, 1 дитина 10 років. У 2021 році в Україні зареєстрували 126 осередків отруєння дикорослими грибами, унаслідок яких постраждало 189 людей, з них 32 дітей.

Летальні наслідки зареєстровані, перш за все, при отруєннях грибами роду *Amanita*. З усіх отруйних шапкових грибів найбільш важкий клінічний перебіг захворювання викликає бліда поганка, найтоксичніший шапковий гриб на Землі, доля якого складає до 90 % летальності від усіх отруйних грибів і вживання його спричинює смерть у 90-95 % (нерідко у 100 %) випадків отруєння [1, 11, 69].

Наведені дані та аналіз літературних джерел за останні роки дає підстави зробити висновок, що отруєння грибами продовжують залишатись актуальною медичною проблемою. Небезпечні для життя отруєння виникають здебільшого при вживанні грибів, які містять гепато-нефротропні та ентеротоксичні чинники, особливо БП.

1.1.2 Характеристика хімічного складу отрути блідої поганки.

Одним з найбільш відомих отруйних грибів вважається *Amanita phalloides* (Бліда поганка, по-англ.: "Death Cap") і близькі до нього види, що також ростуть в Україні (на Півдні України та Закарпатті) - *Amanita verna* (Мухомор весняний, який в Північній Америці називають "destroying angel" або "deadly agaric") і *A. virosa* (Мухомор смердючий) [15, 43, 195].

За даними різних авторів смертельні отруєння складають в 80-100 % випадків на відміну від отруєнь іншими отруйними грибами. За своєю дією токсини блідої поганки, відносяться до найбільш токсичних з відомих у даний час облігантних гепатотоксикантів [15, 48].

Токсини БП – циклопептиди, в основі яких – індольне кільце, молекулярна маса яких 1000 [56].

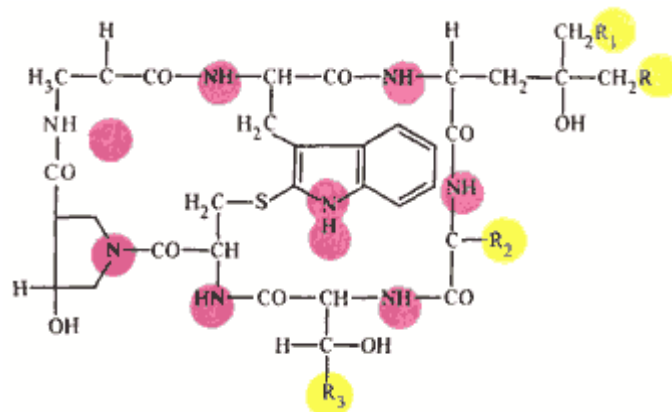
Відомі чисельні спроби виділити отруту БП в чистому виді, які робилися ще в минулому столітті. У 1941 р. Wieland [20], а пізніше Faulstich (1978) [15] встановили структуру грибних токсинів, відповідальних за розвиток важкого ураження. Ними виявилися принаймні, сім гептапептидів (фалотоксини) і вісім циклічних октапептидів (аматоксини). Останні належать до найбільш токсичних з відомих природних отрут. Таким чином, *A. Phalloides* містить дві групи токсинів з різноманітним механізмом дії, які відносяться до циклопептидів: фалотоксини (фалін, фалолізін, фалоїдин, фалоїн, профалоїн, фалізін, фалацин, фалацидин, фализацин) і аматоксини (а-, b-, g-, ε -аманітини, аманін, аманулін, аманулінова кислота, проаманулін) [15, 18].

Летальна доза аматоксинів для людини становить від 5 до 7 мг. На даний час більшість дослідників вважає, що фалотоксини не беруть участі в отруєннях *A. phalloides*, що в значній мірі обумовлені дією одних аматоксинів. Виявлені в *A. phalloides* протеїни хемолізін і фалолізін викликають лізис еритроцитів [17].

Фаллотоксини і аматоксини відрізняються за ступенем токсичності і швидкості прояву ефекту. Перші діють швидко, але менш токсичні. Аматоксини, навпаки, проявляють свою дію більш повільно, але токсичність їх в 20 разів більше фаллотоксинів. Шапка гриба містить більше токсичних речовин, ніж ніжка. Найбільш високий вміст токсинів відзначають в перезрілих грибах [73].

Фаллотоксини – біциклічні гептапептиди, виявлені тільки у видах *Amanita*, піддаються незначній абсорбції після перорального потрапляння в організм.

На рис. 1.1. представлена структурна формула фаллотоксинів, які подібні за хімічним складом і будовою, але відрізняються лише боковими ланцюгами і є похідними лейцину, що містять гідроксильну групу-ОН у γ -положенні.



$R_1=OH$	$R_2=CH_3$	$R_3=CH_3$	$R_4=H$ фалоїдин
$R_1=H$	$R_2=CH_3$	$R_3=CH_3$	$R_4=H$ у фалоїн
$R_1=OH$	$R_2=CH(CH_3)_2$	$R_3=COOH$	$R_4=H$ у фалацидин
$R_1=OH$	$R_2=CH_3$	$R_3=CH_3$	$R_4=OH$ у фалізін

Рис. 1.1. Структурна формула фаллотоксинів.

Фалін був виділений в останні роки з грибів виду поганки і є маловивченою речовиною білкової природи, яка втрачає свою токсичність при нагріванні понад $60^\circ C$ і руйнується в кислому середовищі при значенні рН, що дорівнює 5. На підставі цього вважається, що при пероральному

вживанні блідої поганки і мухомора весняного фалотоксини не є токсичними для людини.

Аматоксини (або аманітотоксини, або аманітоксини) (Рис. 1.2.) є циклічними пептидами, що складаються з амінокислот, замкнутих у кільце атомом сірки. Хімічна структура дев'яти аматоксинів представляється як похідні біциклічні октапептиди; основними є α -, β -, γ -аманітин.

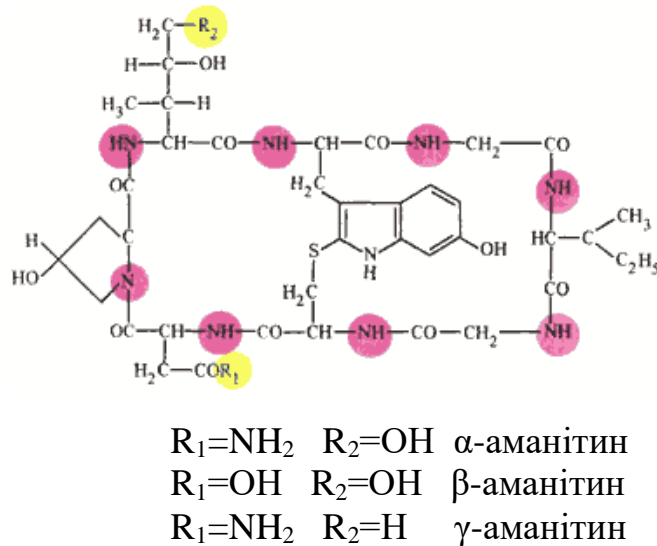


Рис. 1.2. Структурна формула аманітинів

Аматоксини були ідентифіковані як біциклічні октапептиди, утворені принаймні дев'ятьма різними сполуками: α -аманітин, β -аманітин, γ -аманітин, ϵ -аманітин, аманін, аманінамід, аманулін, аманулінова кислота, та проаманілін.

Основні токсикологічні дослідження були зосереджені на токсинах α -аманітину та β -аманітину, тому неможливо зробити остаточних висновків щодо потенційних відмінностей між ними.

Летальна доза α -аманітину для людини становить 0,1 мг/кг [10,11, 176], він є найбільш токсичним із всієї групи токсинів. Таким чином, для дорослої людини з масою тіла 70 кг летальна доза аманітотоксинів становить 7 мг, що відповідає 30-50 г свіжої БП або 150-200 г мухомора весняного [117, 118]. Одна шапочка блідої поганки в середньому містить 10-15 мг аманітину. Для смертельного отруєння достатньо 1 г сирого гриба на 1 кг маси, тобто один

добрий екземпляр блідої поганки здатен отруїти декілька людей, з летальним наслідком 50-90 %.

Аманітини термостабільні і нерозчинні у воді, тому при кулінарній обробці грибів їх токсичність практично не знижується, вони втрачають свою токсичність лише при порушенні біциклічної структури будови.

1.1.3 Токсичний ефект та механізм впливу на організм отрути блідої поганки. Фалоїдини проявляють токсичну дію через 1-6 год, а аматоксини – через 24-48 год після потрапляння їх в організм.

Аматоксини – повільнодіючі, але в 20 разів більш отруйніші, ніж фалотоксини, які дають фіолетове забарвлення з розчином коричневого альдегіду в парах соляної кислоти. Проміжне місце займає повільнодіючий аманін, який дає синє забарвлення з цим реактивом. Фалотоксини, швидкодіючі, з розчином коричневого альдегіду в парах соляної кислоти дають синє забарвлення.

Дія аматоксинів повільніша, ніж фалотоксинів, але обумовлює значно більші ушкодження в організмі. Аманітини насамперед порушують діяльність клітин з високим ступенем білковосинтетичної активності: гепатоцитів, епітелію кишечника, судин ниркового епітелію.

Після абсорбції аманітин попадає в печінку, яка є першим органом, який ушкоджується. Аманітини екскретуються з сечею, де вони виявляються через 17–20 год. Таким чином, нирки є кінцевим органом, який зазнає ушкодження.

Як вже було зазначено, дія грибів *A. phalloides* і *A. verna* в основному пояснюється впливом аматоксинів. Було доведено, що, перш за все, страждають ядра клітин печінки. Ушкодження, які виникають при цьому супроводжуються зменшенням вмісту РНК.

ДНК-залежна РНК-полімераза II здійснює синтез РНК в еукаріотичних клітинах. Транскрипція і-РНК складається з 3-х етапів: ініціації, елонгації і термінації.

Аматоксин зв'язується з ДНК-залежною РНК-полімеразою II типу (або Б) та інгібує транскрипцію, причому РНК-полімераза зберігає здатність до утворення динуклеотидів, тобто порушується процес елонгації РНК, а не ініціації її синтезу. Таким чином, синтез і-РНК блокується на стадії елонгації, тобто подовженні ланцюга і-РНК, який утворився [14, 18].

Аманітин зв'язується з каталітичним активним РНКП II з високою специфічністю і високою спорідненістю ($K_i = 3-4$ нм).

Для ефективного пригнічення транскрипції досить однієї молекули α -аманітину на одну молекулу РНК-полімерази II. При цьому транскрипція ДНК на мРНК повністю блокується при концентрації аманітину близько 10^{-8} М. Такий вплив на РНК-полімеразу та визначає токсичні ефекти аматоксинів. У зв'язку зі здатністю аматоксинів специфічно інгібувати РНК-полімеразу Б, вони знайшли широке застосування в біохімічних дослідженнях. Тривалість отруйної дії залежить від часу, протягом якого підтримується досить висока концентрація ($> 10^{-8}$ М) аманітину в клітинах печінки.

РНК-полімераза I зовсім не чутлива до високих доз α -аманітину, РНК-полімераза III інгібується тільки у високих концентраціях α -аманітину ($10^5 - 10^6$ М), у той же час РНК-полімераза II високочутлива до дії α -аманітину і пригнічується вже при його концентрації ($10^{-9} - 10^{-8}$) М [14, 15].

Припинення синтезу білка призводить до некрозу клітин, що в свою чергу призводить до зниження та пригнічення систем ферментів, виснаженню структури білка, зниженню апопротеїнів, необхідних для синтезу ліпопротеїнів.

В результаті розвивається клітинний стеатоз, який в кінцевому результаті призводить до блокади клітинних функцій та загибелі клітини. Одна молекула аманітину зв'язує 1 полімеразну молекулу з молекулярною масою біля 500 Дальтон. Ця сполука незворотня.

Як наслідок дії аманітинів, підвищується проникливість мембран, блокується синтез мітохондріальних ДНК та білка в клітині, порушуючи

функціонування електроннотранспортної системи та викликаючи енергетичний голод. Все це призводить до метаболічного хаосу та загибелі ураженої клітини. Пошкодження структурних і функціональних властивостей різних мембранних утворень клітини й дезорганізація метаболічних процесів, може сприяти взаємодії амаatokсинів з генетичним апаратом клітини й визначати необоротні зміни. Патологічне підвищення проникності біологічних мембран сприяє попаданню токсичних речовин у тканини та клітини життєвоважливих органів. В результаті відбувається зменшення реактивності органів і тканин, падає ефективність антидотів та інших фармакологічних засобів [28, 29].

Фармакокінетичні дослідження показали, що амаatokсини використовують фізіологічну транспортну систему для жовчних кислот для проникнення в печінку, де необоротно зв'язуються з РНК-полімеразою II. Печінково-кишкова циркуляція підтримує високу концентрацію токсину в гепатоцитах.

Згідно з даними [15] аманітин проникає всередину гепатоцита печінки, використовуючи специфічні транспортні білки - органічні аніон-транспортні поліпептиди - ОАТР 3 (organic anion transporting polypeptide).

Альфа-аманітин повністю гальмує перетворення глюкози в глікоген печінки. Одночасно в печінці знижувався вміст АТФ, піровиноградної і молочної кислот [14, 15].

Фалоїдин діючи на клітинну мембрану, руйнує її, проникаючи всередину клітини, призводить до вивільнення кальцію і, відповідно, росту калію в організмі. З цього моменту відбувається пошкодження лізосом і ендоплазматичного ретикулуму клітини. [11, 18, 17, 14].

Дія фалоїдину призводить до пригнічення окисного фосфорилування, зниження рівня АТФ-ази. Крім зменшення синтезу білка гепатоцитами пригнічується також синтез глікогену. Проникаючи в кров, фалотоксини проявляють в 10 раз слабшу токсичність, ніж амаatokсини.

Високі дози фалоїдину викликають загибель білої миші до 3-х год після введення отрути, в той же час введення α -аманітину – не раніше 15 год.

У щурів після введення фаллоїдину розвивається дистрофія печінки, знижується або повністю припиняється секреція жовчі, через 6 год активність АсАт і АлАт у сироватці крові досягає максимуму.

Смерть на протязі 24 год після вживання блідої поганки (інтоксикації фалоїдином) розвиваються як наслідок важкого гастроінтестинального синдрому і електролітного балансу.

За даними літератури відомо, що рух мембранних структур здійснюється актиноподібними скорочувальними білками – актином і міозином. Вони присутні в усіх еукаріотичних клітинах.

Фалоїдин і його похідні здатні міцно зв'язуватися з фібрилярним актином (F-актином). Позначений родаміном фаллоїдин багато років використовується для візуалізації внутрішньоклітинних структур, що містять актин, при вивченні цитоскелету і будови саркомера.

Інгібуючи деполімерізацію F-актину фалоїдин пригнічує процес цитокінезу в цілому. Одна молекула фаллоїдину здатна утримувати 7 молекул G-актину.

Фалоїдин здатний змінювати функціональну активність актинових волокон, що входять до складу саркомера, і тим самим впливати на скоротність скелетної мускулатури і міокарда. [14, 15, 67, 73].

Вважається, що фалоїдин перешкоджає деполімеризації мікрофіламентів гепатоцитів і викликає холестаза.

Незважаючи на велику увагу, яка приділяється питанням фалоїдинового отруєння в експериментальних роботах, специфічне лікування фалоїдинового синдрому зосереджено на корекції гепато-нефропатії – основних проявах ушкоджуючої дії аматоксинів.

Більше того, деякі автори вказують на незначне всмоктування фалоїдину при пероральному попаданні цього токсину, що, на думку цих

авторів, дозволяє не розглядати фалотоксини серед причин, що викликають смертельні грибні отруєння у людей.

Фалізін – один з фалотоксинів – гемолітична отрута [43].

Отримані результати експериментальних досліджень підтверджують дані про цитотоксичну дію отрути блідої поганки, яка проявляється у її впливі на синтез внутрішньоклітинних ферментів. [14, 15].

Особливістю патофізіологічного процесу є те, що токсини блідої поганки не знешкоджуються ані в шлунку, ані в кишечнику. Вони швидко всмоктуються в травному каналі, причому 57 % їх депонується в печінці, 3 % – в нирках, 9,5 % – у м'язах. Дія токсинів БП нагадує отруєння, викликане фосфором або колхцином. Воно спричинює жирове переродження печінки, ураження ентероцитів шлуново-кишкового тракту, нирок, серця, підшлункової залози, головного мозку та інші значні патологоанатомічні зміни [.....].

Таким чином, отруєння БП призводить до гепатотоксичного, нефротоксичного, ентеротоксичного впливів, збільшенням проникності клітинних мембран з наступним аутолізом клітини. Грибна отрута проявляє тропність до гепатоцитів. В результаті цього порушується ліпопротеновий комплекс, пошкоджуються мембрани мітохондрій, лізосом, ендоплазматичної сітки, пригнічується окисне фосфорилування та синтез глікогену тощо [147, 197, 199].

1.1.4. Застосування ліків на основі розторопші плямистої для лікування та корекції токсичного впливу на організм отрути блідої поганки.

Silybum marianum (Розторопша плямиста) наразі є найбільш дослідженою рослиною, що використовується для лікування захворювань печінки. Активними компонентами розторопші є флавонолігнани, включаючи силібін, силідіанін та силіхрестин, разом відомі як силімарин.

Силібін - це компонент з найвищою антиоксидантною активністю, і екстракти розторопші плямистої, як правило, містять 70-80% силібіну.

Розторопша плямиста (*Silybum marianum*) відома своїм широким спектром терапевтичних властивостей, включаючи антиканцерогенні, протизапальні, імуномодулюючі та противірусні [Letteron P. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice / P.Letteron // Biochem. Pharmacol. – 1990. – Vol. 39. – P. 2027-2034.]. Слід зазначити, що розторопша плямиста широко застосовується при низці захворювань печінки, які характеризуються морфологічними та функціональними порушеннями органу, в тому числі некротичними ураженнями. Основними діючими речовинами плодів розторопші плямистої є флавоноїди (таксифолін, кверцетин, дегідрокверцетин), флаволігнани (силібін, силідіанін, силіхристин), біогенні аміни (тіамін, гістамін), вітаміни К, А та Е. Препарати *S. marianum* на основі силімарину, що містять флавоноїдні речовини, особливо ізомери флаволігнанів, характеризуються найширшими терапевтичними властивостями. Ряд експериментів показав, що силімарин усуває абсцеси, пригнічує харчову та сезонну алергію, знижує рівень холестерину та є антидотом до отрути БП альфа-аманітину [....].

Антиоксидантні властивості силімарину зумовлені здатністю активних компонентів рослини відновлювати глутатіон, пригнічувати активність певних ферментів, що беруть участь в утворенні вільних радикалів кисню, таких як ксантинооксидаза і цитохром Р-450, а також знижувати експресію ФНП- α [.....].

Завдяки своїй антиоксидантній активності силібін застосовується для лікування отруєнь аматоксинами, і є дані про ефективність силібіну у пацієнтів з отруєнням БП.

Силібін здається більш ефективним як монотерапія, ніж у поєднанні з бензилпеніциліном. Насправді, в нещодавньому дослідженні на основі 1500 задокументованих випадків було зроблено висновок, що загальна смертність у пацієнтів з інтоксикацією *A. phalloides*, які отримували силібін у вигляді

препарату Легалон® SIL (силібінін-С-2',3-дигідроген сукцинат, натрієва сіль), становить менше 10% порівняно з більш ніж 20% при застосуванні бензилпеніциліну або комбінації силібіну та бензилпеніциліну (Mengs et al., 2012).

Силібін і силімарин зменшують вільнорадикальне навантаження, стимулюють активність СОД і підвищують рівень GSH (Fraschini et al., 2002). Більше того, Pradhan і Girish (2006) припускають, що силімарин здатний проникати в ядро і специфічно стимулювати активність РНК-полімерази I. Цей ефект збільшує транскрипцію рибосомальної РНК, що може врівноважувати інгібування РНКП II, індуковане аматоксинами (Pradhan and Girish, 2006). Проте ця гіпотеза потребує подальшого підтвердження. Іншим важливим ефектом силібіну є пригнічення органічних аніон-транспортуючих поліпептидів (ОАТPs) (Wlcek et al., 2013), що може виявитися критично важливим для запобігання поглинанню аманітину гепатоцитами.

Національний центр отрут Нової Зеландії рекомендують внутрішньовенне введення 20-50 мг/кг/добу в чотирьох розділених дозах. Лікування слід продовжувати протягом 48-96 годин після вживання гриба (CIAV, 2014; Toxinz, 2013). Рекомендації TOXBASE щодо лікування отруєння *A. phalloides* не включають застосування силібіну (TOXBASE, 2008), ймовірно, через недостатню кількість клінічних даних щодо ефективності силібіну.

Резюме. Таким чином, однією з актуальних проблем залишаються отруєння шапковими грибами, які за показниками важкості перебігу та кількості летальних наслідків впевнено посідають перше місце серед усіх небактеріальних харчових отруєнь. Найтоксичнішим зі всіх шапкових грибів на Землі продовжує залишатися бліда поганка (*Amanita phalloides*), яка містить фалотоксини й аматоксини, що є причиною важких уражень різних систем і органів організму.

Проблема вивчення процесів травлення і всмоктування поживних речовин у шлунково-кишковому тракті завжди була в центрі уваги гастроентерології. Особливістю патофізіологічного процесу дії токсинів блідої поганки є те, що вони не знешкоджуються ані в шлунку, ані в кишечнику і швидко всмоктуються в травному каналі, уражаючи структури шлунково-кишкового тракту, печінки, нирок, серця, підшлункової залози, головного мозку і призводять до значних патолого-анатомічних змін у інших органах і системах.

Отже, експериментальне дослідження показників білкового обміну за умов ураження токсинами БП у різні терміни токсичного гепатиту з подальшою корекцією екстрактом розторопші є актуальною проблемою, яка вимагає поглибленого різностороннього вивчення, що є необхідним для прогнозування тяжкості перебігу патологічного процесу, пошуку антидотів та розробки методів лікування таких отруєнь.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Відбір тварин для дослідження.

Досліди проведені на білих статевозрілих безпородних щурах-самцях масою тіла 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Експерименти виконано в Центральній науково-дослідній лабораторії ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”, акредитованій МОЗ України. Усі експериментальні процедури проведено відповідно до національних та міжнародних рекомендацій щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами (Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986); Закон України № 3447–IV, 2006). Порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Отруєння тварин здійснювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення екстракту блідої поганки, отриманого за методом Wieland [24], в дозі 85 мг/кг маси тіла ($1/2$ LD₅₀). Інтактним тваринам перорально вводили відповідну кількість 0,9 % розчину NaCl. Евтаназію щурів проводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом через 6, 24 та 72 год після отруєння. Всі піддослідні тварини були поділені на такі групи: I – інтактні щурі; II – тварини, уражені токсинами блідої поганки. Дослідженню підлягали цільна кров, плазма крові, сироватка крові, III – тварини, уражені токсинами блідої поганки, яким проводилась корекція токсикозу екстрактом розторопші.

2.2. Дослідження показників білкового обміну.

2.2.1 Методика визначення концентрації загального білка біуретовим методом.

Визначення концентрації загального білка проводили, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика».

Принцип методу полягає в тому, що білки сироватки крові реагують з купрум (II) сульфатом в лужному середовищі з утворенням комплексних сполук фіолетового кольору (біуретова реакція). Інтенсивність забарвлення комплексу купрум-іонів з функціональними групами пептидного зв'язку пропорційна вмісту білка.

Концентрацію білка у сироватці крові виражали у г/л.

2.2.2 Визначення фракцій білків сироватки крові методом електрофоретичного розділення на агарозі. Для дослідження білкових фракцій використовували діагностичний набір для електрофоретичного розділення білків сироватки крові на агарозі «Согмау gel protein 100» виробництва фірми «Согмау» (Австрія).

Плазму крові змішували з робочим розчином вероналового буфера (співвідношення 1:1), після чого наносили 5 мкл розчину на пластинку за допомогою спеціального трафарету. Електрофорез проводили у камері для електрофорезу виробництва фірми «Согмау» протягом 20 хв при напрузі 100 В. Після завершення електрофорезу пластинки витримували 15 хв у фіксажі (розчин етанолу та оцтової кислоти), висушували при 80 °С і занурювали на 10 хв у розчин барвника амідочорного 10 В. Після знебарвлення у трьох послідовних ваннах пластинки промивали дистильованою водою та висушували в струмені повітря при температурі 80°С. Електрофореграми розшифровували на денситометрі цієї ж фірми.

2.2.3 Визначення вмісту сечовини у сироватці крові. Концентрацію сечовини в сироватці крові визначали діацетилмонооксимним методом, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика».

Принцип методу: сечовина утворює з діацетилмонооксимом у присутності іонів заліза і тіосемікарбазиду комплекс червоного кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту сечовини в сироватці крові.

Концентрацію сечовини в сироватці крові виражали у ммоль/л.

2.2.4 Визначення концентрації креатиніну у сироватці крові. Визначення концентрації креатиніну проводили, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика».

Принцип методу. Пікринова кислота у лужному середовищі утворює з креатиніном продукт жовто-червоного кольору (похідне 2,4,6-три-нітроциклогексадієну). Інтенсивність забарвлення досліджуваного розчину прямопропорційна концентрації креатиніну у пробі. У сироватці крові креатинін визначали після депротейнування розчином трихлороцтової кислоти %.

Концентрацію креатиніну в сироватці крові виражали у мкмоль/л.

2.3 Дослідження протеїназо-інгібіторної системи

2.3.1 Визначення загальної протеолітичної активності плазми крові. Принцип методу полягає в тому, що при інкубації білкових азосполук у присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться у тканинах відбувається лізис азоальбуміну (розпад низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (розпад високомолекулярних протеїнів) та азоколагену (колагеноліз), інтенсивність якого оцінювали за ступенем забарвлення інкубаційного середовища на спектрофотометрі СФ – 46 при довжині хвилі 440 нм [22].

Для визначення протеолітичної активності сироватки, у пробірку, що містила 1,5 мл боратного буфера і 1 мг азоальбуміну (азоказеїну або азоколагену), додавали 0,5 мл сироватки крові, інкубували при 37 °С упродовж 15 хв. У всі пробірки додавали 2 мл дистильованої води і

залужували середовище 5 моль/л розчином NaOH (50 мкл). Вміст пробірок фільтрували для видалення непрореагованої азосполуки і визначали екстинкцію розчинів на спектрофотометрі СФ-46 проти розчину порівняння (0,5 мл дистильованої води, 1,5 мл боратного буфера, 1 мг азосполуки). Протеолітичну активність визначали в одиницях екстинкції на 1 мл сироватки за 1 годину.

2.3.2 Визначення вмісту α_2 -М в сироватці крові.

Визначення вмісту α_2 -М визначали спектрофотометрично, відповідно до здатності інгібітора утворювати активний комплекс з трипсином, який може розщеплювати хромогенний субстрат N-аргінін-бензоіл-DL-пара-нітроанлід (БАНПА) [19]. При розщепленні БАНПА трипсином утворюється забарвлений в жовтий колір п-нітроанілін, кількість якого визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 383 нм.

Для виконання методики використовували трипсин ("Spofa", Чехія), який розчиняли з розрахунку 5,5 мг на 5 мг 0,0025 N HCl, ex tempore розбавляли 0,05 моль/л фосфатним буфером в 4 рази. Хромогенний субстрат БАНПА готували перед використанням наступним чином: на 43,5 мг субстрату (0,001 моль/л розчин) суспендували в 1 мл ацетону, додавали 70 мл 0,05 моль/л фосфатного буферу рН 7,6 та ставили в водяний термостат при температурі 80 ° C на 30 хв. Після цього об'єм розчину доводили до 100 мл названим буфером.

В ході визначення до 0,3 мл сироватки розбавленої в 20 разів, додавали 0,3 мл розчину трипсину (250 мкг на 1 мл). Для утворення комплексу α_2 -М - трипсин суміш витримували 15 хв при кімнатній температурі, добавляли 0,2 мл соєвого інгібітора для нейтралізації трипсину. Через 15 хв загальний об'єм проби доводили до 1 мл 0,05 моль/л фосфатним буфером (рН 7,6) та додавали 3,2 мл 0,001 М розчину БАНПА. Проби інкубували в термостаті при температурі 30 °C 30 хв. Комплекс α_2 -М – трипсин розщеплює БАНПА, внаслідок чого утворюється пара-нітроанілін, кількість якого є мірою

активності трипсину в комплексі з α_2 -М. Реакцію зупиняли додаванням 1,4 мл 5 % розчину фосфорновольфрамислової кислоти (в 1 М ацетатному буфері (рН 4,5)). Осад відділяли шляхом центрифугування проб при 3000 об/хв 30 хв. У прозорому супернатанті визначали оптичну щільність на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 383 нм в кюветі з товщиною 10 мм, порівнюючи пробу з контролем.

Кількість α_2 -М визначали за калібрувальним графіком, в якому по осі абсцис відкладено кількість трипсину, а по осі ординат – оптична щільність проб, в яких відбувся гідроліз БАПНА відповідною концентрацією трипсину.

Кількість α_2 -М виражали в г/л сироватки крові.

2.3.3 Визначення вмісту α_1 -інгібітора протеаз в сироватці крові. Метод базується на здатності α_1 -інгібітора протеаз сироватки крові пригнічувати гідроліз трипсином N-бензоїл-DL-аргінін-пара-нітроаніліду (БАПНА). В той же час трипсин у комплексі з α_2 -М здатний розщеплювати БАПНА [21].

Під час визначення до плазми крові додають фермент (трипсин) в кількості, надлишковому по відношенню до усіх трипсинзв'язуючих білків. Вміст α_1 -інгібітора протеаз визначають за різницею між відомою кількістю трипсину і ферментом, що залишився після його взаємодії з інгібіторами плазми.

В ході визначення до 0,4 мл плазми крові, розведеної в 100 разів, додавали 0,2 мл трипсину (10 мкг), витримували протягом 15 хвилин, при температурі 20 °С та доводили об'єм проби до 1 мл фосфатним буфером. Після цього додавали 3,2 мл 0,001 М розчин БАПНА. та витримували у термостаті при температурі 35 °С протягом 20 хвилин. Реакцію зупиняли 1,4 мл 5 % розчину фосфорновольфрамислової кислоти. Контрольні проби проводили так само, як і дослідні, тільки БАПНА додавали після фосфорновольфрамислової кислоти. Крім того, паралельно ставили реакцію з трипсином без додавання сироватки. Осад відділяли шляхом

центрифугування проб при 3000 об/хв та у прозорому супернатанті визначали оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 383 нм в кюветі з товщиною 10 мм, порівнюючи пробу з контролем.

Кількість α_1 – інгібітора протеаз визначали за калібрувальним графіком, в якому по осі абсцис відкладено кількість трипсину (1 – 10 мкг), а по осі ординат – оптична щільність проб, в яких відбувся гідроліз БАПНА відповідною концентрацією трипсину.

Кількість α_1 – інгібітора протеаз виражали в мкмоль/л сироватки крові.

2.4. Методи дослідження стану плазматичних мембран

2.4.1 Визначення активності аланінамінотрансферази.

Визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) проводили по методу Райтмана-Френкеля, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика».

Принцип методу. В результаті взаємодії 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном під дією АлАТ, утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Визначення ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразону піровиноградної кислоти, який в лужному середовищі дає коричнево-червоне забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти.

Активності АлАТ у сироватці крові виражали у ммоль/(год·л).

2.4.2 Визначення активності аспартатамінотрансферази.

Визначення активності аспартатамінотрансферази (АсАТ) проводили по методу Райтмана-Френкеля, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика».

Принцип методу. В результаті амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аспарагіновою кислотою, яке відбувається під дією АсАТ, утворюються L-глутамінова та щавелевоцтова кислоти, остання декарбоксілюється з утворенням піровиноградної кислоти. Визначення ґрунтується на

вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразону піровиноградної кислоти, який в лужному середовищі дає коричнево-червоне забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти.

Активності АсАТ у сироватці крові виражали у ммоль/(год·л).

2.5 Методи математичного аналізу

Отриманий цифровий матеріал був оброблений методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента. Для розрахунків використовували комп'ютерну програму Microsoft Excel XP.

Розраховували середні арифметичні величини (M), похибки середніх арифметичних (m), коефіцієнти варіації, а також середні квадратичні відхилення. Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$. У рисунках та таблицях основної частини дисертації рівень значимості вказували тільки для достовірних результатів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Згідно із класифікацією отрут біологічного походження, токсини блідої поганки належать до надзвичайно токсичних отрут. Сумарний вміст токсинів та їх співвідношення залежать від часу і місця збирання, ґрунту, погоди та віку блідої поганки, загальна токсичність і час клінічних проявів коливаються у широких межах [5, 9].

Після встановлення хімічної структури, синтезу фалоїдину і альфа-аманітину експериментальні дослідження патогенезу отруєнь токсинами блідої поганки проводяться в основному з використанням синтетичних аманіта- та фалотоксинів. У той же час вплив нативної отрути блідої поганки, яка складається із 18 відомих нині токсинів на білковий обмін у щурів з подальшою корекцією розторопшею в експерименті практично не вивчався.

При вивченні етапності дії отрути блідої поганки було встановлено, що фалотоксини проникають у клітину шляхом системи активного транспорту, і проявляється у найближчі 6 год після попадання в організм. При цьому порушуються структура і функції мембран, а аманітини, більше всього, проникають у клітинне ядро шляхом простої дифузії, де пізніше проявляють інгібуючу дію на генетичний апарат клітини.

Отруєння тварин здійснювали, ввівши їм одноразово внутрішньочеревно екстракт БП, отриманий за методом Н. Wieland [43], у дозі 85 мг/кг маси тіла ($1/2$ LD₅₀).

Для вивчення впливу аманіта-фалоїдинового токсину на організм щурів попередньо було встановлено токсичність БП (екстракту гриба), ступінь токсичності оцінювали за летальністю отруєних тварин.

Проведені експериментальні дослідження гострої токсичності БП, яка росла в Тернопільській області.

Для отримання екстракту зібрану в лісах БП очищували у день збору від домішок, потім гриби промивали під проточною водою та гомогенізували в електроподрібнювачі. До гомогенату додавали метанол у масовому співвідношенні 1:30 (гриби:метанол), кип'ятили 30 хв, фільтрували за допомогою водоструминної помпи. Після цього метанол випаровували до отримання маслянистої краплі, яку суспендували ізотонічним розчином натрію хлориду з таким розрахунком, щоб доза токсину, яку вводили, містилась в 1 мл. Хроматографічним дослідженням підтверджували відсутність метанолу в робочому розчині екстракту.

При розрахунках летальних доз виходили із сухої маси грибів. Для цього частину грибів з кожного збору сушили до постійної маси (вміст води в грибах коливався в межах 93–97 % від сирої маси). Токсичність отрути БП визначали за Кербером [13].

3.1 Токсичність отрути блідої поганки

Для постановки експерименту використовували загальноприйняті методичні принципи та прийоми [15, 22]. У токсикологічних дослідженнях використали 30 щурів-самців з середньою масою 190-210 г. Екстракт БП вводили тваринам внутрішньочеревинно, за ними спостерігали протягом 3-х діб. Про ступінь токсичності витяжки судили за дозою екстракту, виживанням і тривалістю життя щурів, які згодом загинули.

У дослідах при встановленні гострої токсичності екстракту БП тварини були розділені на 5 груп (по 6 щурів), на яких досліджувалась одна доза грибного екстракту - від найменшої (120 мг/кг), яка не спричиняла загибелі тварин, до максимальної (200 мг/кг), після введення якої гинули всі отруєні білі щури. Із 30 тварин, отруєних екстрактом БП, у найближчі 24 год від початку досліду загинуло 9 щурів (30 %), протягом перших 2-х діб – 11 (37 %), на 3-ю добу – 1 тварина. ЛД₅₀ склала 170 мг/кг. ЛД₅₀ є статистично

визначеною оцінкою і представляє найкраще оцінювання доз, які викликають смерть у 50 % живих організмів [7, 15].

Обробку результатів дослідження проводили за формулою [15]:

$$ЛД_{50} = ЛД_{99} - \sum (z \cdot d) / m,$$

де $ЛД_{99}$ – доза екстракту, яка викликала смерть у всієї групи тварин, мг/кг,

d – інтервал між кожними двома суміжними дозами,

z – середнє арифметичне числа тварин, у яких спостерігався ефект під впливом двох суміжних доз отрути,

m – кількість тварин у кожній групі (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Обробка цифрових даних вивчення гострої токсичності екстракту
блідої поганки за методом Кербера**

Статистичний показник	Доза, мг/кг				
	120	140	160	180	200
Вижило	6	5	4	3	0
Загинуло	0	1	2	3	6
z	0,5	1,5	2,5	4,5	
d	20	20	20	20	
$z \cdot d$	10	30	50	90	

На підставі розрахунків отримані такі дані:

$$\sum (z \cdot d) = 10 + 30 + 50 + 90 = 180$$

$$ЛД_{99} = 200 \text{ мг/кг}; m = 6;$$

$$ЛД_{50} = 200 - 180/6 = 200 - 30 = 170 \text{ мг/кг}.$$

3.2 Клінічні прояви введення отрути блідої поганки

Протягом перших 20-30 хв після внутрішньочеревинного введення БП в дозі ЛД₅₀ щури ставали збудженими, потім пригніченими. В середньому через годину після отруєння у тварин виникало часте сечовипускання. Всі піддослідні тварини тягнулися до холодного місця (металічна підлога клітки, поїлка). У переважної більшості щурів спостерігали млявість, гіподинамію. Протягом перших 2-х діб досліду більшість щурів відмовлялася від води та їжі, у деяких з них спостерігалася спрага. Багато тварин ставали неохайними, їхня шерсть втрачала природний блиск, кал був напіврідкої консистенції. За 1-2 год до загибелі у більшості щурів розвивався судорожний стан, дихання ставало частим і поверхневим. При патологоанатомічному дослідженні в деяких щурів при розтині порожнини на парієтальному та вісцеральному листках очеревини спостерігалися субсерозні точкові крововиливи. Шлунок переповнений шмістом, шлунок і кишки були роздуті, судини брижі, тонкої і товстої кишок розширені, повнокровні. Виявлялось різке повнокров'я органів черевної порожнини, точкові крововиливи в шлунку, тонкій і товстій кишках, печінці. У деяких тварин спостерігалися парез кишечника. Печінка збільшених розмірів із втраченою консистенцією, дрябла, блідо-червоного кольору з жовтуватими вогнищами. У тварин, які вижили, з 3-5-ї доби після отруєння стан покращувався і через 7 діб від початку досліду за зовнішнім виглядом вони не відрізнялися від інтактних щурів.

Для об'єктивного відображення цих процесів визначали в динаміці масу тіла тварин контрольної і дослідних груп, що дало можливість до завершення експерименту прослідкувати його динаміку.

З наведених на рисунку 3.1 результатів видно, що у тварин, яким вводили екстракт БП динаміка приросту маси тіла і абсолютні показники були нижчими, ніж у тварин контрольної групи.

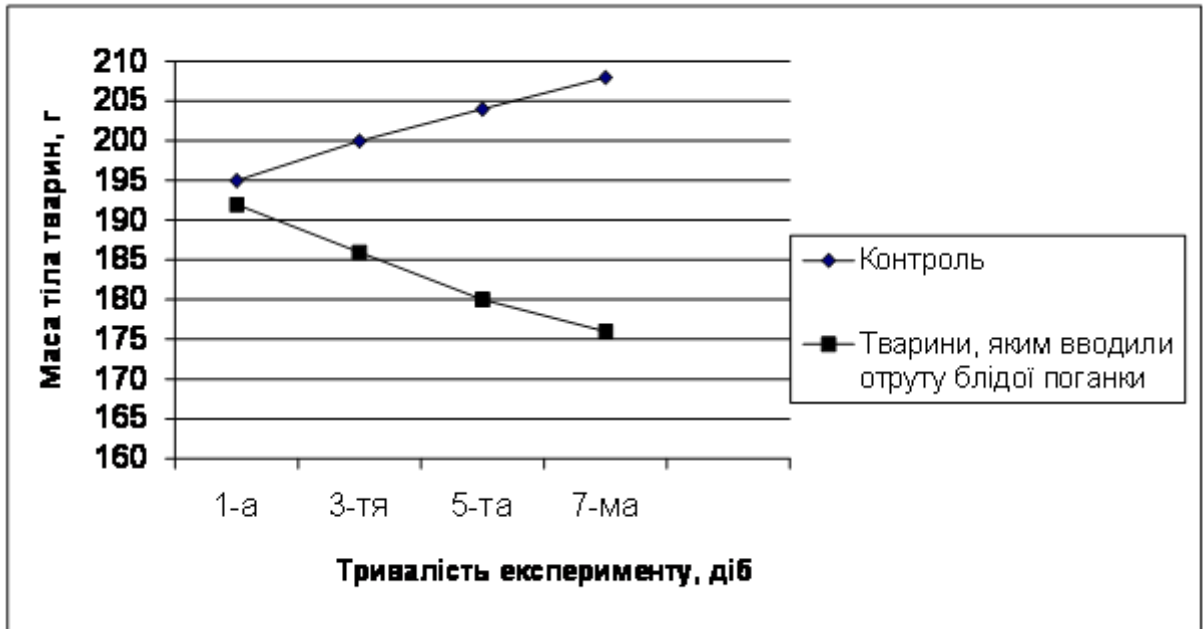


Рис. 3.1 Динаміка приросту маси тіла у щурів при 7-ми добовому введенні екстракту блідої поганки: 1 – контрольна група; 2- тварини, яким вводили екстракт блідої поганки.

3.3. Особливості порушень білкового обміну у щурів за умов гострого отруєння блідою поганкою.

3.3.1 Особливості білкового складу крові при аманіта-фалоїдиновому отруєнні у тварин.

Відомо, що рівень загального білка в сироватці крові відображає забезпеченість організму поживними і пластичними речовинами. Проведені нами дослідження показали (табл. 3.1), що спостерігалось зниження концентрації загально білка в сироватці крові у всі терміни експерименту(6, 24 та 72 год після отруєння БП) з максимумом через 72 год (на 32 %; $p < 0,001$) відносно інтактних тварин.

Таблиця 3.1

Вміст загального білка (г/л) в сироватці крові щурів з токсичним ураженням білою поганкою ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин						
	інтактні	уражені БП, термін після отруєння (год)			Корекція екстрактом розторопші, термін після отруєння (год)		
		6	24	72	6	24	72
Загальний білок, г/л	70,36 ±1,9	62,24±1,78 $p_1 < 0,05$	50,63±1,31 $p_1 < 0,001$	47,93±1,62 $p_1 < 0,001$	55,8 ±2,5 $p_2 < 0,05$	58,1 ±3,4 $p_2 < 0,05$	60,5 ±4,2 $p_2 < 0,01$

Примітки: тут і в наступних табл.

p_1 – відмінності достовірні порівняно з тваринами контрольної групи;

Оскільки печінка є основним місцем синтезу білків, то, природно, при її токсичному ураженні функціональна здатність органа знижується. Вказані зміни свідчать про те, що токсичне ураження організму тварин БП призводить до пригнічення синтезу білків гепатоцитами печінки, що проявляється вираженою гіпопротеїнемією, яка, у свою чергу, зумовлює зменшення загальної опірності організму.

Як видно з таблиці 3.1 введення екстракту розторопші сприяло підвищенню рівня загального білка. Так, на через 72 год після отруєння концентрація загального білка в плазмі крові становила 86 % від рівня інтактних тварин,

Крім концентрації загального білка у крові тварин, дуже важливим показником є значення альбумінів та глобулінів, оскільки співвідношення між різними класами білкових структур свідчить про наявність чи відсутність в організмі запального процесу.

Альбуміни перш за все є пластичним матеріалом для синтезу білків тканин, ферментів та інших сполук, необхідних для безперервних обмінних процесів в організмі тварин. Крім вираженої гіпопротеїнемії, нами відмічена також гіпоальбумінемія, про що свідчить вірогідне зменшення вмісту альбумінів у крові тварин, що теж пояснюється зниженням білоксинтезувальної функції печінки внаслідок негативної дії на їх організм отрути БП.

Таблиця 3.2

Співвідношення білкових фракцій сироватки крові у щурів під впливом токсинів блідої поганки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник		Група тварин						
		інтактні	уражені БП, термін після отруєння (год)			Корекція екстрактом розторопші, термін після отруєння (год)		
			6	24	72	6	24	72
Альбуміни, %		52,21±0,8	43,09±1,26 $p_1 < 0,001$	34,14±1,18 $p_1 < 0,001$	32,54±0,49 $p_1 < 0,001$	45,5 ± 3,0 $p_2 < 0,01$	46,6 ± 2,4 $p_2 < 0,01$	50,2 ± 3,5 $p_2 < 0,01$
Глобуліни, %	α_1 -глобуліни	5,62±0,17	4,55±0,25 $p_1 < 0,05$	4,34±0,16 $p_1 < 0,001$	4,8 ± 0,2 $p_2 < 0,02$	4,9 ± 0,4 $p_2 < 0,01$	5,3 ± 0,6 $p_2 < 0,05$	5,9 ± 0,5 $p_2 < 0,05$
	α_2 -глобуліни	9,21±0,12	8,76±0,14 $p_1 < 0,05$	7,62±0,19 $p_1 < 0,001$	6,9 ± 0,3 $p_2 < 0,05$	9,2 ± 0,2 $p_2 < 0,01$	8,6 ± 0,7 $p_2 < 0,01$	7,6 ± 0,7 $p_2 < 0,01$
	β -глобуліни	17,31±0,42	19,24±0,3 $p_1 < 0,01$	20,59±0,20 $p_1 < 0,001$	24,75±0,31 $p_1 < 0,001$	18,24±0,3 $p_1 < 0,01$	19,59±0,40 $p_1 < 0,001$	18,75±0,21 $p_1 < 0,001$
	γ -глобуліни	15,26±0,13	25,25±0,23 $p_1 < 0,001$	30,54±0,23 $p_1 < 0,001$	29,04±0,15 $p_1 < 0,001$	20,25±0,3 $p_1 < 0,001$	25,24±0,23 $p_1 < 0,001$	22,24±0,5 $p_1 < 0,001$
Альбуміни/глобуліни		1,1±0,01	0,75±0,02 $p_1 < 0,001$	0,54±0,02 $p_1 < 0,001$	0,5±0,01 $p_1 < 0,001$			

Як видно з даних табл. 3.2, вміст альбуміну в плазмі крові щурів достовірно знижувався відносно контролю на 17, 35 та 38 % через відповідні терміни після аманіта-фалоїдинової інтоксикації.

Спостерігалася тенденція до зниження α_1 - та α_2 - та збільшення β - та γ -глобулінових фракцій порівняно з контрольною групою (табл. 3.2). Так, концентрація α_1 - та α_2 -глобулінів лінійно знижувалась протягом дослідження, причому максимальні її зміни спостерігались через 72 год після інтоксикації і становили, відповідно, на 25 та 29 % менше від рівня інтактних тварин. Щодо β - та γ -глобулінів, то їх вміст теж достовірно підвищувався через 6, 24 та 72 год після ураження БП. Проте, найбільших змін зазнали γ -глобуліни. Дана фракція збільшилася у 2 рази порівняно з контрольною групою через 24 год після інтоксикації.

Оскільки, 75-90 % α_1 - та α_2 - глобулінів синтезується в печінці, то зниження їх вмісту можна пояснити пригніченням білоксинтезуючої функції печінки внаслідок токсичного ураження БП, а також їх зменшення свідчить про тяжкі деструктивні процеси в печінці (цироз, гепатит).

Фракція γ -глобулінів складається з імуноглобулінів (IgG, IgA, IgM, IgE), які функціонально є антитілами, що забезпечують гуморальний імунітет. Підвищення вмісту в крові γ -глобулінів є одним з основних критеріїв прояву мезенхімно-запального синдрому, який вказує на активізацію гуморального імунітету.

Той факт, що в уражених тварин вміст γ -глобулінів у крові значно збільшився відносно інтактних (гіпергаммаглобулінемія), свідчить про те, що підвищився синтез імунних білків – імуноглобулінів у відповідь на патологічний процес в організмі, спричинений аманіта-фалоїдиною інтоксикацією.

Альбуміновий коефіцієнт (відношення між кількістю альбумінів і сумою глобулінів) вказує на зменшення онкотичного тиску крові, внаслідок

чого можуть розвинути набряки тканин, а також зростання катаболізму білків.

Як видно (табл. 3.2.), в уражених щурів відбувається різке зменшення білкового коефіцієнта порівняно з таким у інтактних тварин. Вказані зміни свідчать про активну імунологічну реакцію організму на дію токсину.

Чітке зростання в сторону норми під впливом екстракту розторопші проявила і концентрація альбуміну в плазмі крові (табл. 3.2). Найкращий ефект спостерігався через 72 год експерименту, коли концентрація альбуміну становила 96 % від рівня інтактних тварин.

При визначенні окремих фракцій глобулінів протягом всіх днів експерименту нами зафіксовано чітку тенденцію до збільшення вмісту α_1 - та α_2 - глобулінів та щодо зниження β - та γ - глобулінів у всі терміни експерименту після корекції екстрактом розторопші.

3.4.2 Стан протеїназо-інгібіторної системи у тварин з аманіта-фалоїдиновим отруєнням. Одним з основних напрямків сучасних наукових досліджень є вивчення системи протеолізу як особливої форми біологічної регуляції.

Протеолітичні ферменти мають високу біологічну активність і беруть участь у регуляції функцій різних органів і систем організму та біологічних процесів. Протеолітичні ферменти не тільки здійснюють неспецифічну деградацію білкових молекул, але й регулюють біологічні функції і системи, що досягається за допомогою загальних і обмежених протеолітичних реакцій. Згідно з сучасними уявленнями, саме протеолітичні ферменти підтримують баланс між загибеллю, деградацією та регенерацією клітин. [6, 14].

Вміст у крові та тканинах специфічних білків (α_1 -ІІ, α_2 -М, антитромбіну ІІІ, α_2 -антиплазміну, α_1 -антихімотрипсину та ін.), які

утворюють комплекси з протеїназами, є однією з найбільш важливих ланок контролю за протеолізом [2, 10]. У фізіологічних умовах активність протеолітичних ферментів та рівень інгібіторів протеїназ збалансовані. За критичних умов динамічна рівновага між протеазами та їхніми інгібіторами порушується, спричиняючи деструктивні та запальні зміни в усьому організмі. [3, 4].

Відомо, що активація процесів тканинного протеолізу є важливою ланкою в патогенезі захворювань різних органів [16, 17]. Проте, патогенетичні механізми, пов'язанні з активацією протеолітичних систем при отруєнні БП практично не вивчались.

Зважаючи на це, метою було дослідити протеїназо-інгібіторну систему у здорових щурів та отруєних токсинами БП.

Аналіз результатів дослідження (табл. 3.3) показав, що у щурів з гострим отруєнням БП протеолітична активність плазми крові (ПАК) збільшувалась. Через 24 год з моменту введення отрути відбувається достовірне зростання лізису азоальбуміну, азоказеїну та азоколу (в 1,9; 1,8; та 1,8 рази відповідно) порівняно з інтактними щурами. Через 72 год експерименту ПАК у тварин, уражених БП, дещо знижувалась в порівнянні з показниками через 24 год з моменту введення отрути, однак залишалась достовірно вищою від норми і складала 146, 145 та 95 % відповідно.

Таблиця 3.3

Вплив токсинів блідої поганки на показники протеолітичної активності крові у щурів ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Групи тварин						
	інтактні	уражені БП, термін після отруєння (год)			Корекція екстрактом розторопші, термін після отруєння (год)		
		6	24	72	6	24	72
Лізис азоальбуміну,	2,45±0,17	3,03±0,15 $p_1 < 0,05$	4,71±0,09 $p_1 < 0,001$	3,58±0,15 $p_1 < 0,01$	3,37 ± 0,27	3,08 ± 0,16	2,84 ± 0,13

E ₄₄₀ /мл/год					p ₂ <0,01	p ₂ <0,001	p ₂ <0,001
Лізис азоказеїну, E ₄₄₀ /мл/год	2,13± 0,09	2,87±0, 04 p ₁ <0,00 1	3,76±0,1 7 p ₁ <0,001	3,55±0, 07 p ₁ < 0,001	3,04 ± 0,31 p ₂ <0,01	2,95 ± 0,23 p ₂ <0,001	2,67 ± 0,35 p ₂ <0,01
Лізис азоколу, E ₄₄₀ /мл/год	1,58± 0,08	1,86±0, 07 p ₁ <0,05	2,85±0,0 3 p ₁ <0,001	2,33±0, 06 p ₁ <0,00 1	0,92 ± 0,10 p ₂ <0,05	0,81 ± 0,12 p ₂ <0,01	0,64 ± 0,08 p ₂ <0,001

Таким чином, за умов отруєння токсинами БП збільшується кількість продуктів деградації азоальбуміну, азоказеїну та азоколагену в усіх дослідних групах, що свідчить про підвищену деградацію високо- і низькомолекулярних білків та колагену. Очевидно, зростання ПАК зумовлене перш за все впливом фалотоксинів, максимум дії яких спостерігали на 12-24 години від моменту отруєння. Фалотоксини, як відомо, здатні зв'язуватись із поверхнею клітин печінки, клітинними мембранами, викликаючи пошкодження мембран мітохондрій, що призводить до пригнічення реакцій окиснювального фосфорилування і зниження енергетичного потенціалу клітини, а також ендоплазматичного ретикулуму, лізосом, що в свою чергу, спричиняє загибель клітини.

Введення екстракту розторопші зумовило достовірне зниження ПАК. Так, інтенсивність лізису низькомолекулярних білків через 72 год експерименту становила 121 % від норми. Деградація високомолекулярних протеїнів після корекції екстракту розторопші також достовірно зменшувалась і через 72 год становила 125 % від рівня інтактних тварин. Щодо колагенолітичної активності крові, то через 72 год експерименту вона становила 110 % від рівня інтактних тварин.

При критичних станах відбувається також порушення динамічної рівноваги між протеазами та їх інгібіторами. У наших дослідженнях

виражених змін зазнавала активність **білкових інгібіторів плазми крові** (табл. 3.4, рис. 3.2.).

Встановлено достовірне підвищення інгібіторного потенціалу крові, в основному за рахунок збільшення концентрації α_1 -ІІІ, яка збільшилася на 35 % вже через 6 год після введення ортути БП. Щодо α_2 -М, то його концентрація теж зросла, але лише в 1,3 раза через 6 год після введення ортути БП в порівнянні з інтактними тваринами.

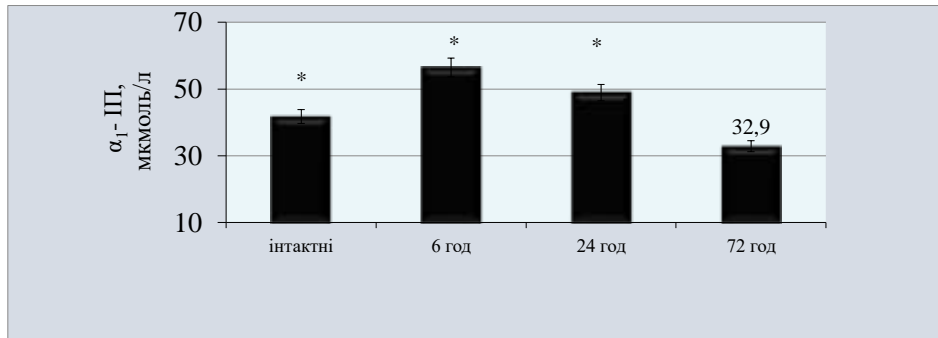
Таблиця 3.4

Динаміка концентрації інгібіторів протеолізу плазми крові щурів з токсичним отруєнням блідою поганкою ($M \pm m, n=6$)

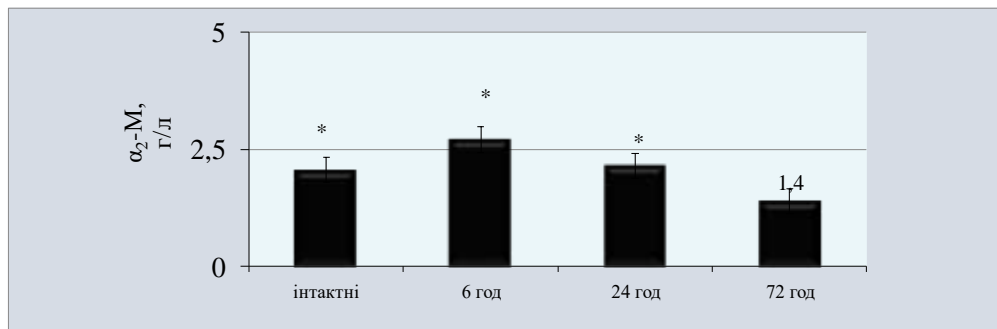
Показник	Групи тварин			
	інтактні	уражені БП, термін після отруєння (год)		
		6	24	72
α_1 - ІІІ, мкмоль/л	41,75±1,5	56,45±2,56 $p_1 < 0,01$	48,95±2,08 $p_1 < 0,05$	32,9±0,77 $p_1 < 0,01$
α_2 - М, г/л	2,06±0,22	2,71±0,13 $p_1 < 0,05$	2,15±0,17 $p_1 > 0,05$	1,4±0,1 $p_1 < 0,05$

Помітне збільшення вмісту α_1 -ІІІ у перші години після отруєння може бути пов'язане зі збільшенням продукції α_1 -ІІІ паралельно зі збільшенням продукції інших білків гострої фази у відповідь на токсичне ураження печінки. Крім того, підвищення активності ключових білкових інгібіторів можна розглядати як неспецифічну захисну реакцію на посилення протеолізу та запуск процесу фізіологічної адаптації у відповідь на потрапляння токсину в організм. Ці дані узгоджуються з дослідженнями інших авторів [22].

У наступні терміни дослідження (рис. 3.2.) ми спостерігали зниження білкових інгібіторів протеїназ плазми крові. Зокрема, через 72 год від моменту отруєння концентрація α_1 -ІІІ у крові щурів знизилась в 1,3 раза порівняно з інтактними тваринами. Концентрація α_2 -М у щурів була нижчою в 1,5 раза порівняно з інтактними.



(А)



(Б)

Рис. 3.2. – Динаміка концентрації інгібіторів протеолізу плазми крові щурів з токсичним отруєнням БП: (А) α₁-інгібітор протеїназ та (Б) α₂-макроглобулін (M±m, n=6)

Примітка: Тут і в наступн. рис. * – достовірно відмінне від відповідних значень в контрольній групі p<0,05.

Крім зниження протеолітичної активності крові введення екстракту розторопші сприяло достовірному підвищенню інгібіторного потенціалу крові. Вміст α₁-інгібітору протеїназ у плазмі крові був достовірно вищим від відповідних величин в уражених тварин протягом всіх днів експерименту і на 7-у добу його величина становила 94 % від рівня інтактних тварин (табл.5.5).

Концентрація α₂- макроглобуліну через 6 год експерименту збільшилась на 32,1 %, через 24 год - на 37,2 %, і через 72 год – на 58 % від рівня уражених тварин, за абсолютною величиною наближаючись до норми (96 % від рівня інтактних тварин).

3.4.3 Вплив отрути блідої поганки на стан клітинних мембран у щурів.

Одним з найважливіших показників метаболізму організму є рівень активності ферментів-трансаміназ - АлАТ (КФ 2.6.1.2) та АсАТ (КФ 2.6.1.1). Трансамінази, зокрема АсАТ, беруть участь у синтезі сечовини; є дані, що АсАТ бере участь у транспорті через плазматичну мембрану, енергетичній функції мітохондрій та передачі нервових імпульсів у синапсі [9].

Відомо, що зміни каталітичної активності певних ферментних систем є прямим індикатором цілісності клітин і внутрішньоклітинних органел [7]. Вміст цитоплазматичних ферментів у позаклітинному просвіті плазми і тканин відносно низький. Однак пошкодження клітинних мембран і підвищення проникності клітин викликають ряд змін всередині клітини, що призводять до пошкодження клітинних органел і виходу ферментів з цитоплазми.

Таблиця 3.5. та рис. 3.3., 3.4 зображують зміни ферментної активності ферментів переамінування АлАТ та АсАТ та коефіцієнт де Рітіса за умов отруєння екстрактом блідої поганки у щурів.

Таблиця 3.5

Зміни ферментної активності АлАТ, АсАТ (ммоль·год/л) та коефіцієнт де Рітіса у сироватці крові щурів за умов отруєння токсинами блідої поганки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Групи тварин			
	інтактні	уражені БП, час після отруєння (год)		
		6	24	72
АлАТ	1,35±0,09	6,75±0,08 $p_1 < 0,001$	10,8±0,12 $p_1 < 0,001$	4,86±0,03 $p_1 < 0,001$
АсАТ	1,22±0,02	4,76±0,11 $p_1 < 0,001$	7,34±0,08 $p_1 < 0,001$	4,77±0,05 $p_1 < 0,001$

АсАТ/АЛАТ	0,9±0,01	0,4±0,01 p ₁ <0,001	0,71±0,02 p ₁ <0,001	0,98±0,03 p ₁ <0,001
-----------	----------	-----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------

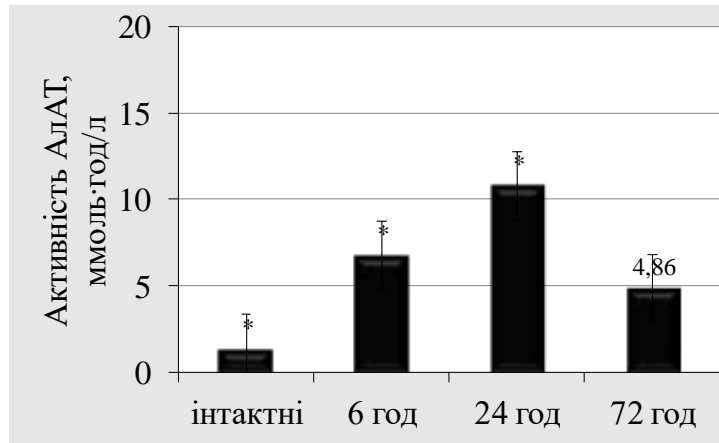


Рис. 3.3. – Зміни активності АЛАТ у крові щурів, уражених отрутою білої поганки ($M \pm m$; $n=6$).

Встановлено підвищення активності ферменту АЛАТ відповідно через 6, 24, 72 год експерименту у сироватці крові щурів у 5,0; 8,0; 3,6 раза, порівняно з показниками тварин інтактної групи.

Найбільш виражені зміни вмісту АЛАТ спостерігалися через 24 години після введення щурам токсину БП. Очевидно, що пік токсичного гепатиту припадає на перші 24 години експерименту. Незважаючи на цю тенденцію, активність обох ферментів все ще була значно вищою, ніж у інтактних щурів через 72 години після експерименту, що свідчить про те, що регенерація печінкової тканини в цей час ще не завершилася.

Враховуючи, що АЛАТ є органоспецифічним ферментом печінки, підвищення його активності в плазмі слід вважати наслідком цитотоксичної дії БП на гепатоцити, яка супроводжувалася пошкодженням клітинної мембрани та підвищенням проникності гепатоцитів.

Подібних змін зазнавав ще один цитозольний фермент печінки – АсАТ.

Під впливом отрути БП на організм щурів зафіксовано також достовірне зростання АсАТ у всі терміни дослідження. Так, через 6, 24 та 72 години експерименту ензимна активність даного фермента зростала у 3,9; 6 та 4 раза відповідно в порівнянні із контролем (табл. 3.5., рис. 3.4.).

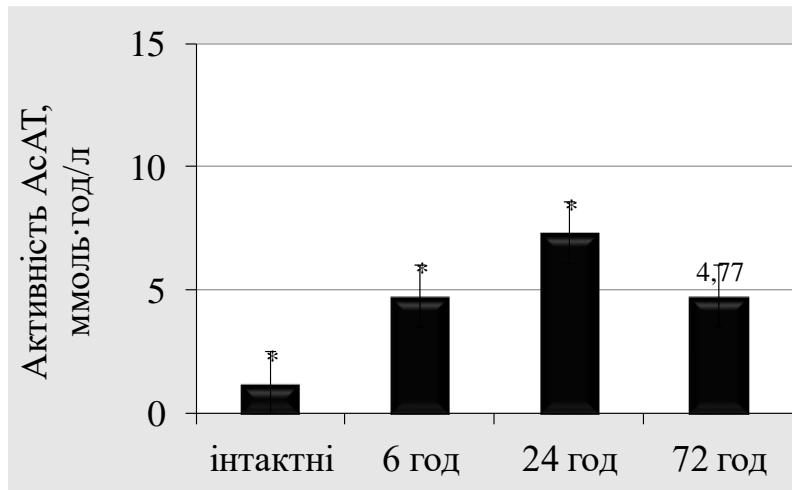


Рис. 3.4. – Зміни активності АСТ у крові щурів, уражених отрутою блідої поганки ($M \pm m$; $n=6$).

Як свідчать результати, у щурів з аманіто-фалоїдиновим отруєнням, активність досліджуваних ферментів, які є маркерами цитолітичного синдрому, зростала протягом усього періоду дослідження.

Підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові, як відомо, є наслідком гепатоцелюлярного ушкодження, а також посилення біосинтезу ферментів тканиною печінки. Запальний процес, що характеризується підвищеною проникністю мембран і цитолізом гепатоцитів, призводить до вивільнення АЛТ, яка є переважно цитозольним ферментом. У некротичних умовах підвищується активність АсАТ - ферменту, локалізованого в мітохондріях [7-8], про що свідчить той факт, що активність АСТ перевищувала активність АЛТ через 72 години після впливу токсину БП, що вказує на більш глибоке пошкодження структурної організації гепатоцитів.

Виявлена нами динаміка активності досліджуваних амінотрансфераз служить опосередкованим доказом порушення цілісності структури мембран гепатоцитів і свідчить про виснаження функціональних можливостей печінки.

Значення АсАТ / АлАТ (коефіцієнт де Рітіса) достовірно знижувався у щурів у 2,3 рази через 6 год після отруєння, порівняно з інтактними щурами,

що свідчить про більш глибоку ступінь ураження паренхіми печінки вже в перші години після отруєння.

Отож, ураження токсинами БП супроводжується цитолітичним синдромом, на що вказує достовірне зростання активності амінотрансфераз у сироватці крові у всі терміни дослідження.

Під впливом застосованих з метою корекції порушень метаболізму середників вже через 6 год експерименту проявилася тенденція до зміни досліджуваних показників в сторону їх зменшення. Через 24 та 72 год експерименту активність АсАТ в плазмі крові зазнала істотного зменшення і за абсолютною величиною наблизилась до норми (137 % від рівня інтактних тварин). Аналогічні за спрямованістю зміни встановлені й для АлАТ, величина активності якої через 24 год експерименту практично зрівнялася з такою у інтактних тварин (117 % від рівня інтактних тварин).

3.4.5 Стан детоксикаційної функції печінки з аманіта-фалоїдиною інтоксикацією.

Як відомо, одним з показників функціонального стану нирок є рівень сечовини як кінцевого продукту метаболізму білків. Синтез сечовини відбувається в печінці в основному з аміаку, який утворюється при дезамінуванні амінокислот, розпаді пуринових і піримідинових нуклеотидів. Через кров сечовина потрапляє до нирок і виводиться нирками із сечею печінки [4-6, 10].

Під час синтезу сечовини знешкоджується аміак. Концентрація сечовини залежить від інтенсивності її синтезу та виведення [6, 11].

Таблиця 3.6.

Концентрація сечовини (ммоль/л) у сироватці крові щурів за умов отруєння токсинами блідої поганки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин			
	інтактні	уражені БП, термін після отруєння (год)		
		6	24	72
Концентрація сечовини (ммоль/л)	6,32±0,15	5,45±0,16 p ₁ <0,01	4,45±0,26 p ₁ <0,001	3,78±0,14 p ₁ <0,001

Як показали результати наших досліджень, під впливом отрути БП у організмі щурів відбувається зниження концентрації сечовини у всі досліджувані терміни, що свідчить про зниження детоксикаційної функції печінки. Так, концентрація сечовини у сироватці крові щурів через 6, 24 та 72 год після ураження БП знизилась (на 13; 30 та 40 % відповідно до термінів) в порівнянні з контролем (табл. 3.6).

Зниження вмісту сечовини в сироватці крові при досліджуваній патології може свідчити про інтенсивне руйнування гепатоцитів, аліментарне та пригнічення сечовиноутворювальної функції печінки внаслідок тяжкої печінкової патології. При цьому печінка має значний функціональний резерв (синтез сечовини зберігається навіть при ураженні 85% паренхіми).

Оскільки синтез сечовини відбувається в гепатоцитах печінки, безпосередньо в мітохондріях, можна говорити про значні структурно-метаболічні порушення функцій енергетичного обміну та знешкодження аміаку при отруєнні БП [13].

Введення екстракту розторопші зумовило підвищення вмісту сечовини в сироватці крові через 24 год на 44 % в порівнянні з ураженими тваринами.

Нами зафіксоване також зростання концентрації креатиніну у плазмі крові досліджуваних щурів (табл. 3.7.).

Таблиця 3.7.

Концентрація креатиніну (ммоль/л) у сироватці крові щурів за умов отруєння токсинами блідої поганки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин			
	інтактні	уражені БП, термін після отруєння (год)		
		6	24	72
Креатинін, ммоль/л	9,55±0,1	11,42±0,13 $p_1 < 0,001$	13,58±0,13 $p_1 < 0,001$	14,4±0,08 $p_1 < 0,001$

Креатинін - один із кінцевих продуктів азотного обміну використовують як непрямий маркер рівня гломерулярної фільтрації нирок [4, 5].

Вміст креатиніну в сироватці крові після моделювання отруєння вірогідно максимально збільшився у щурів відносно контролю через 72 год після отруєння (у 1,5 раза), що свідчить про значне порушення функціонального стану нирок та розвиток гострої ниркової недостатності, а також ступінь вираженості катаболічних процесів [8].

Підсумовуючи результати дослідження даного розділу, можна зробити наступні **висновки**: гостре отруєння токсинами блідої поганки призводить до виражених порушень білоксинтезувальної функції печінки і розвитку диспротеїнемії, що проявляється гіпопротеїнемією, гіпоальбумінемією, порушенням співвідношення білкових фракцій за рахунок зниження концентрацій α_1 - і α_2 -глобулінів та збільшення концентрацій β - і γ -глобулінів. Доведено, що гостра аманіта-фалодінова інтоксикація спричиняє підвищення катаболізму білків з порушенням знешкодження кінцевих продуктів, зростання протеолітичної активності крові й фазові зміни

інгібіторного потенціалу крові, а також порушення проникності мембран гепатоцитів.

Результати наших досліджень, описані в даному розділі, показали, що введення екстракту розторопші сприяло достовірному підвищенню вмісту загального білка. Чітке зростання в сторону норми під впливом екстракту розторопші проявила і концентрація альбуміну в плазмі крові. Нами зафіксовано чітку тенденцію до нормалізації співвідношення між різними фракціями глобулінів у корегованих тварин. Так концентрація α_1 - та α_2 -глобулінів після введення екстракту розторопші збільшувалася. Щодо β - та γ -глобулінів, то їх вміст під впливом досліджуваного середника достовірно знижувався відносно уражених тварин. Введення екстракту розторопші зумовило підвищення вмісту сечовини в плазмі крові, що свідчить про покращення детоксикаційної функції печінки.

Про позитивний вплив застосованого середника на стан білкового обміну тварин свідчать показники протеїназо-інгібіторної системи, виражені через протеолітичну активність крові, вміст α_1 - ІІ та α_2 - М. Використання екстракту розторопші зумовило достовірне зниження протеолітичної активності крові та підвищення концентрації інгібіторів протеїназ уражених щурів. Такі статистично достовірні зміни показників протеолізу у бік норми, очевидно є проявом покращення функціональної здатності печінки, спрямованої на відновлення гомеостазу внутрішнього середовища організму шляхом посилення синтезу білків. Це підтверджує думку, що екстракту розторопші має виражену анаболічну дію.

Підвищення концентрації інгібіторів в плазмі крові за умов введення екстракту розторопші може бути обумовлене тим, що цей препарат впливає на метаболічну ланку гомеостазу, підсилюючи інтенсивність анаболічних процесів. Завдяки своїм властивостям екстракт розторопші підсилює синтез α_2 - макроглобуліну та α_1 -інгібітору протеїназ – глікопротеїнів плазми крові,

що беруть участь у контролі за активністю протеїназ широкого спектру дії шляхом специфічного комплексоутворення.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Особливої актуальності, в аспекті загрози незадовільного результату захворювання та збільшення числа отруєнь, набувають випадки гострих отруєнь аманітальними грибами, до яких відносять бліду поганку *Amanita phalloides*. Рівень летальності серед даних отруєнь в останні роки, навіть на фоні сучасного лікування, іноді сягає 90–95 % [13].

Оскільки токсини БП є дуже сильними отрутами і специфічного антидоту до них не існує, лікування цих отруєнь залишається важливою проблемою.

Не випадково, що й аналіз літератури останніх років свідчить про стійку тенденцію до збільшення числа отруєнь блідою поганкою, а використання найбільш ефективних методів терапії навіть у провідних токсикологічних центрах не дає можливості знизити смертність нижче 29 %. Така висока летальність та відсутність прямої антидотової терапії при отруєннях блідою поганкою зумовлюють постійну увагу лікувальних організацій багатьох країн, у т.ч. й України. Саме цим пояснюється інтерес дослідників до експериментального вивчення питань, пов'язаних із раннім виявленням порушень метаболізму, пошуку ефективних методів лікування та корекції патологічних змін.

В літературі також представлені результати вивчення особливостей реакцій крові людини на отруту блідої поганки на доклінічному і клінічному етапах та корекції виявлених порушень на основі застосування у комплексній терапії пеніциліну. Зокрема, встановлено, що застосування пеніциліну у складі комплексної терапії аманіто-фалоїдинового гепатиту в токсикогенній фазі екзоінтоксикації сприяє більш швидкому усуненню клініко-лабораторних проявів захворювання, значно зменшує летальність [14, 15].

Встановлено ефективність використання гістидинату міді та тіотриазоліну у разі експериментального ураження нирок аманіто-фаллоїдиною отрутою [38].

На основі проведеного аналізу вітчизняних та доступних зарубіжних публікацій було встановлено, що у науковій літературі наведено багато інформації щодо дослідження вуглеводного, енергетичного, ліпідного обміну [6, 13, 18], а також вивчення механізмів токсичної дії отрути БП на живі істоти [12, 7, 8, 15], але щодо впливу токсинів на білковий обмін, існує невелика кількість даних.

Таким чином, проведення біохімічних досліджень з метою виявлення метаболічних порушень, зокрема білкового обміну, за умов ураження токсинами БП є актуальною проблемою, яка вимагає поглибленого різностороннього вивчення, що є необхідним для прогнозування тяжкості перебігу патологічного процесу, пошуку та розробки методів лікування таких отруєнь з урахуванням вікових особливостей організму.

Оскільки токсини БП спричиняють порушення білоксинтезуючої функції печінки, метою нашої роботи було дослідження особливостей порушень деяких показників білкового обміну в щурів, уражених токсинами блідої поганки в динаміці з подальшою корекцією екстрактом розторопші.

Відповідно до мети роботи, визначено такі основні завдання:

- дослідити особливості вмісту загального білка і співвідношення білкових фракцій сироватки крові тварин, уражених токсинами БП;
- з'ясувати вплив аманіто-фаллоїдинових токсинів на процеси взаємодії із субстратом протеїназ організму білих щурів і встановити ланки, які найбільш чутливі до їх дії.
- оцінити вплив токсинів БП на стан плазматичних мембран гепатоцитів у щурів;
- оцінити стан детоксикаційної функції печінки.

Дослідження проводили на безпородних білих щурах-самцях, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Отруєння тварин здійснювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення екстракту блідої поганки, отриманого за методом Wieland [24] в дозі 85 мг/кг маси тіла ($\frac{1}{2}$ LD₅₀). Евтаназію щурів проводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом через 6, 24 та 72 год після отруєння з подальшим забором крові. Експерименти проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2000) та узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Білоксинтезувальну функцію печінки оцінювали за концентрацією загального білка та білкових фракцій. У сироватці крові визначали активність аланінамінотрансферази (АлАТ, КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1) – маркерних ферментів стану мембран гепатоцитів. Оцінювали стан протеїназо-інгібіторної системи – за загальною протеолітичною активністю крові, концентрацією α_1 -інгібітора протеїназ та α_2 -макроглобуліну; стан детоксикаційної функції печінки – за вмістом сечовини, креатиніну.

Дослідження проводили в динаміці (на 6, 24 та 72 години після останнього введення отрути). Контрольною групою служила група інтактних щурів.

В результаті проведеної роботи ми отримали наступні результати.

Введення тваринам екстракту БП призводило до суттєвих порушень обміну білків. Так, концентрація *загального білка* вірогідно знижувалась щодо інтактних – на 12 ($p < 0,05$), 28 та 32 % ($p < 0,001$) через 6, 24 і 72 год експерименту відповідно.

Крім концентрації загального білка в крові, важливим показником, що характеризує функцію печінки, є *концентрація альбумінів та глобулінів*, особливо співвідношення між цими показниками. Вміст білкових фракцій сироватки крові щурів з токсичним ураженням БП відображено в таблиці 3.2.

За умов отруєння токсинами БП організму тварин, окрім загальної гіпопротеїнемії, в крові щурів спостерігали виражену гіпоальбумінемію. Вміст альбуміну в сироватці крові вірогідно знижувався відносно контролю через 6, 24 і 72 год – на 17, 35 та 38 % ($p < 0,001$) відповідно.

Спостерігали тенденцію до зменшення α_1 - та α_2 - і збільшення β - та γ -глобулінових фракцій порівняно з контрольною групою (табл. 3.2). Так, концентрація α_1 - та α_2 -глобулінів лінійно знижувалась протягом дослідження, причому максимальні її зміни спостерігались через 72 год після інтоксикації і становили, відповідно, на 25 та 29 % менше від рівня інтактних тварин. Щодо β - та γ -глобулінів, то їх вміст теж достовірно підвищувався через 6, 24 та 72 год після ураження БП. Проте, найбільших змін зазнали γ -глобуліни. Дана фракція збільшилася у 2 рази порівняно з контрольною групою через 24 год після інтоксикації, що пояснюється пригніченням білоксинтезуючої функції печінки внаслідок токсичного ураження БП, а також їх зменшення свідчить про тяжкі деструктивні процеси в печінці (цироз, гепатит) та є одним з основних критеріїв прояву мезенхімно-запального синдрому, який вказує на активізацію гуморального імунітету.

Зміни, що виникли призвели до зниження альбуміно-глобулінового коефіцієнта, який становив – 50.

Аналіз результатів дослідження (табл. 3.3) показав, що у щурів з гострим отруєнням БП протеолітична активність плазми крові (ПАК) збільшувалась, що підтверджується достовірним зростанням лізису азоальбуміну, азоказеїну та азоколу через 24 год з моменту введення отрути (в 1,9; 1,8; та 1,8 рази відповідно). Через 72 год експерименту ПАК у тварин, уражених БП, дещо знижувалась в порівнянні з показниками через 24 год з

моменту введення отрути, однак залишалась достовірно вищою від норми і складала 146, 145 та 95 % відповідно.

Таким чином, за умов отруєння токсинами БП збільшується кількість продуктів деградації азоальбуміну, азоказеїну та азоколагену в усіх дослідних групах, що свідчить про підвищену деградацію високо- і низькомолекулярних білків та колагену. Очевидно, зростання ПАК зумовлене перш за все впливом фалотоксинів, максимум дії яких спостерігали на 12–24 години від моменту отруєння.

При отруєнні БП відбулось порушення динамічної рівноваги між протеазами та їх інгібіторами [13]. У наших дослідженнях значних змін зазнавала активність білкових інгібіторів плазми крові (табл. 3.4). На 6-ту годину експерименту встановлено вірогідне підвищення інгібіторного потенціалу крові, в основному за рахунок збільшення вмісту α_1 -ІІІ, який зріс на 35 % ($p < 0,01$) відповідно відносно інтактних тварин. Щодо α_2 -М, то його концентрація теж підвищилась через 6 год у відповідь на токсичне ураження печінки ортутою – на 32 % ($p < 0,05$) у щурів порівняно з інтактними.

У наступні терміни дослідження ми спостерігали зниження білкових інгібіторів протеїназ плазми крові з максимумом через 72 год від моменту отруєння.

Помітне збільшення вмісту α_1 -ІІІ у перші години після отруєння може бути пов'язане зі збільшенням продукції α_1 -ІІІ паралельно зі збільшенням продукції інших білків гострої фази у відповідь на токсичне ураження печінки. Крім того, підвищення активності ключових білкових інгібіторів можна розглядати як неспецифічну захисну реакцію на посилення протеолізу та запуск процесу фізіологічної адаптації у відповідь на потрапляння токсину в організм. Ці дані узгоджуються з дослідженнями інших авторів.

У процесах обміну речовин живого організму трансамінази, зокрема АЛАТ та АсАТ, відіграють суттєву роль, зумовлену їх участю в

переамінуванні амінокислот, а також у спряженні амінокислотного і вуглеводного обмінів.

Встановлено підвищення активності ферменту АлАТ відповідно через 6, 24, 72 год експерименту у сироватці крові щурів у 5,0; 8,0; 3,6 раза, порівняно з показниками тварин інтактної групи.

Найбільш виражені зміни вмісту АлТ спостерігалися через 24 години після введення щурам токсину БП. Очевидно, що пік токсичного гепатиту припадає на перші 24 години експерименту. Незважаючи на цю тенденцію, активність обох ферментів все ще була значно вищою, ніж у інтактних щурів через 72 години після експерименту, що свідчить про те, що регенерація печінкової тканини в цей час ще не завершилася.

Враховуючи, що АлТ є органоспецифічним ферментом печінки, підвищення його активності в плазмі слід вважати наслідком цитотоксичної дії БП на гепатоцити, яка супроводжувалася пошкодженням клітинної мембрани та підвищенням проникності гепатоцитів.

Подібних змін зазнавав ще один цитозольний фермент печінки – АсАТ.

Під впливом отрути БП на організм щурів зафіксовано також достовірне зростання АсАТ у всі терміни дослідження. Так, через 6, 24 та 72 години експерименту ензимна активність даного фермента зростала у 3,9; 6 та 4 раза відповідно в порівнянні із контролем ($p < 0,001$) (табл. 3.5., рис. 3.4.), що свідчить про ушкодження клітин печінки.

Той факт, що через 72 год після ураження токсинами БП активність АсАТ перевищувала аналогічний показник АлАТ, що вказує на значно глибші порушення структурної організації гепатоцитів. Активність обох ферментів через 72 год досліду продовжувала залишатися вірогідно вищою порівняно з інтактними щурами, що свідчило про неповну регенерацію тканини печінки у цей термін дослідження.

Ці зміни, очевидно, пояснюються тим, що через 12-48 годин від моменту отруєння максимуму сягає дія фаллотоксинів – швидкодіючих

токсинів блідої поганки, дещо пізніше, діють аманітатоксини, які в сукупності визначають токсичний ефект отрути, що й призводить до патологічного підвищення проникності біологічних мембран, а також сприяє попаданню токсичних речовин у тканини та клітини життєвоважливих органів.

Зниження концентрації сечовини у всі досліджувані терміни, під впливом отрути БП свідчить про зниження детоксикаційної функції печінки. Так, концентрація сечовини у сироватці крові щурів через 6, 24 та 72 год після ураження БП знизилась (на 86; 70 та 60 % відповідно до термінів) в порівнянні з контролем (табл. 3.6). Це свідчить про пригнічення сечовиноутворювальної функції печінки внаслідок інтенсивного розпаду гепатоцитів. Оскільки синтез сечовини відбувається в гепатоцитах печінки, безпосередньо в мітохондріях, можна говорити про значні структурно-метаболічні порушення функцій енергетичного обміну та знешкодження аміаку при отруєнні БП.

Вміст креатиніну в сироватці крові після моделювання отруєння вірогідно збільшився у щурів відносно контролю, причому максимальні зміни також спостерігались через 72 год після отруєння (у 1,5 раза, $p < 0,001$), що вказує на значне порушення функціонального стану нирок. (табл.3.7.).

Таким чином, проведене нами дослідження показало, що аманітофалоїдинова інтоксикація супроводжується виразними змінами білкового обміну, що проявляється у зниженні вмісту загального білка плазми крові, диспротеїнемією, активацією протеїназ і пригніченням їх інгібіторів, пошкодженням плазматичних мембран та підвищенням проникності гепатоцитів.

Введення екстракту розторопші сприяло достовірному підвищенню вмісту загального білка. Чітке зростання в сторону норми під впливом екстракту розторопші проявила і концентрація альбуміну в плазмі крові. Нами зафіксовано чітку тенденцію до нормалізації співвідношення між

різними фракціями глобулінів у корегованих тварин. Так концентрація α_1 - та α_2 - глобулінів після введення екстракту розторопші збільшувалася. Щодо β - та γ - глобулінів, то їх вміст під впливом досліджуваного середника достовірно знижувався відносно уражених тварин. Введення екстракту розторопші зумовило підвищення вмісту сечовини в плазмі крові, що свідчить про покращення детоксикаційної функції печінки.

Про позитивний вплив застосованого середника на стан білкового обміну тварин свідчать показники протеїназо-інгібіторної системи, виражені через протеолітичну активність крові, вміст α_1 - ІІ та α_2 - М. Використання екстракту розторопші зумовило достовірне зниження протеолітичної активності крові та підвищення концентрації інгібіторів протеїназ уражених щурів. Такі статистично достовірні зміни показників протеолізу у бік норми, очевидно є проявом покращення функціональної здатності печінки, спрямованої на відновлення гомеостазу внутрішнього середовища організму шляхом посилення синтезу білків. Це підтверджує думку, що екстракту розторопші має виражену анаболічну дію.

Підвищення концентрації інгібіторів в плазмі крові за умов введення екстракту розторопші може бути обумовлене тим, що цей препарат впливає на метаболічну ланку гомеостазу, підсилюючи інтенсивність анаболічних процесів. Завдяки своїм властивостям екстракт розторопші підсилює синтез α_2 - макроглобуліну та α_1 -інгібітору протеїназ – глікопротеїнів плазми крові, що беруть участь у контролі за активністю протеїназ широкого спектру дії шляхом специфічного комплексоутворення.

ВИСНОВКИ

У результаті вирішення наукового завдання кваліфікаційної роботи зроблено такі наукові та прикладні висновки:

1. Гостре отруєння токсинами блідої поганки супроводжується порушенням білоксинтезувальної функції печінки та розвитком диспротеїнемії, що найбільш виражено у тварин через 72 год експерименту. Про це свідчать вірогідне зниження концентрації загального білка в плазмі крові від рівня інтактних тварин (на 32 %; $p < 0,001$), зменшення фракцій альбумінів, α_1 - і α_2 -глобулінів (на 25, 29 %; $p < 0,001$) з одночасним зростанням фракцій β - та γ -глобулінів. Щодо β - та γ -глобулінів, то їх вміст теж достовірно підвищувався через 6, 24 та 72 год після ураження БП. Проте, найбільших змін зазнали γ -глобуліни. Дана фракція збільшилася у 2 рази порівняно з контрольною групою через 24 год після інтоксикації.

2. Аналіз результатів дослідження (табл. 3.4) показав, що у щурів з гострим отруєнням БП протеолітична активність плазми крові (ПАК) збільшувалась, що підтверджується достовірним зростанням лізису азоальбуміну, азоказеїну та азоколу через 24 год з моменту введення отрути (в 1,9; 1,8; та 1,8 рази відповідно). Через 72 год експерименту ПАК у тварин, уражених БП, дещо знижувалась в порівнянні з показниками через 24 год з моменту введення отрути, однак залишалась достовірно вищою від норми і складала 146, 145 та 95 % відповідно.

3. Встановлено достовірне підвищення інгібіторного потенціалу крові, в основному за рахунок збільшення концентрації α_1 -ІП, яка збільшилася на 32 % через 6 год після введення ортути БП. Щодо α_2 -М, то його концентрація теж зросла, але лише в 1,3 раза через 6 год після введення ортути БП в порівнянні з інтактними тваринами. Через 24 год дослідження інгібіторний потенціал поступово зменшується, і до 72-ї год він вірогідно нижчий, ніж в інтактних тварин. Зростання активності основних білкових

інгібіторів можна розцінювати як неспецифічну захисну реакцію організму на посилений протеоліз та запуск фізіологічних процесів адаптації у відповідь на надходження отрути в організм

4. Гостра аманіта-фалоїдинова інтоксикація призводить до зміни показників у крові щурів, які характеризують стан детоксикаційної функції печінки (креатинін, сечовина). Зміни щодо концентрацій даних показників найбільш виражені в організмі щурів через 72 год від моменту отруєння. Концентрація сечовини вірогідно знижується у сироватці крові на 40 % ($p < 0,001$), порівняно з інтактними тваринами.

Вміст креатиніну в сироватці крові після моделювання отруєння вірогідно збільшується у щурів відносно інтактних, причому максимальні зміни також спостерігались через 72 год після отруєння (у 1,5 рази ($p < 0,001$), що вказує на значне порушення функціонального стану нирок та розвиток гострої ниркової недостатності.

Отримані результати свідчать про підвищення інтенсивності катаболічних процесів в отруєному організмі, яке супроводжується деструкцією білкових молекул і зростанням вмісту кінцевих продуктів азотового обміну.

3. Дослідили функціональний стан плазматичних мембран, що супроводжувалося підвищенням активності ферментів-маркерів цитолізу - АлАТ та АсАТ. Максимальні зміни активності амінотрансфераз в сироватці крові спостерігались через 24 години від моменту отруєння. Ензимна активність АлАТ – у 8 разів, а АсАТ – у 6 разів зростали в порівнянні із контролем, що свідчить про розпал токсичного гепатиту на 24 год експерименту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Андрейчин С. М. Особливості проявів ендогенної інтоксикації до і після проведеного лікування хронічної серцевої недостатності / С. М. Андрейчин, М. І. Марущак // Медична хімія. – 2006. – № 3. – С. 126–129.
2. Андрейчин С. М. Сучасні уявлення про метаболічну ендогенну інтоксикацію / С. М. Андрейчин, Т. О. Голомша // Інфекційні хвороби. – 2012. – № 1. – С. 84–87.
3. Бабак О. Я. Протеїназно – інгібіторна система та її вплив на окремі фактори неспецифічного і специфічного імунного захисту організму / О. Я. Бабак, І. В. Талалай // Буковинський медичний вісник. – 1999. – Т. 3, № 4. – С. 214–218.
4. Бідниченко Ю. І. Діагностика отруень блідою поганкою за допомогою імунохроматографічної системи / Ю. І. Бідниченко // Проблеми діагностики, профілактики та лікування екзогенних та ендогенних інтоксикацій : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. – Чернівці, 2004. – С. 27–28.
5. Бойчук Б. Р. Отруєння грибами (етіологія, патогенез, клініка, диференціальна діагностика, лікування і профілактика) / Б. Р. Бойчук. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1997. – 200 с.
6. Влізло В.В. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В.В. Влізло, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич; за ред. В.В. Влізла. – Львів: СПОЛОМ, 2012. – 764 с.
7. Досвід використання Гепасолу НЕО 8 % при лікуванні синдрому печінкової енцефалопатії, зумовленої отруєнням аманітальними грибами / І.П. Шлапак, С.М. Недашківський, О.А. Галушко [та ін.]. // Медицина невідкладних станів. – № 3(34). – 2011. – С. 58.

8. Деякі аспекти патогенезу синдрому ендогенної інтоксикації / С.В. Дзига, О.В. Бакалець, Л.М. Сас [та ін.] Вісник наукових досліджень. – 2011. – № 3. – С. 15–16.
9. Клінічна лабораторна діагностика: Практичні заняття з клінічної біохімії: навч. посіб. / Л.П. Аксененко, З.С. Баркаган, З.П. Гетте [та ін.]; за ред. М.А. Базарної, З.П. Гетте. - К.: Вища шк., 1994. – 423 с.
10. Кузьмак І. П. Вікові особливості азотого обміну у щурів за умов отруєння токсинами блідої поганки / І. П. Кузьмак // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, № 4. – С. 97–105.
11. Кузьмак І. П. Динаміка показників ендогенної інтоксикації у щурів різного віку за умов гострого отруєння токсинами блідої поганки / І. П. Кузьмак, І. М. Кліщ, О. З. Яремчук // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія : Біологія. – 2012. – Вип. 33. – С. 154–157.
12. Кузьмак І. П. Динаміка показників цитолізу у щурів за умов гострого отруєння токсинами блідої поганки у віковому аспекті / І. П. Кузьмак // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 1, Т. 2 (99). – С. 121–124.
13. Кузьмак І. П. Зміна показників протеїназо-інгібіторної системи у щурів різних вікових періодів за умов гострого токсичного ураження блідою поганкою / І. П. Кузьмак, І. М. Кліщ // Медична хімія. – 2011. – Т. 13, № 3 (48). – С. 116–120.
14. Кузьмак І. П. Особливості білкового складу крові при аманіта-фалоїдиновому отруєнні / І. П. Кузьмак // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2012. – № 2. – С. 44–49.
15. Кузьмак І. П. Стан білкового обміну у статевонезрілих щурів за умов токсичного ураження блідою поганкою в експерименті / І. П. Кузьмак, І. М. Кліщ // Медична хімія. – 2009. – Т. 11, № 4. – С. 43–47.

16. Кузьменко С. А. Вплив отрути блідої поганки на морфологію еритроцитів в людини / С. А. Кузьменко // Лікарська справа. – 1992. – № 6. – С. 96–98.

17. Локай Б. А. Ультраструктурні зміни в печінці за умов отруєння блідою поганкою та корекції кокарбоксілазою та ліпоєвою кислотою / Б. А. Локай, К. С. Волков // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – Вип. 3. – С. 73–75.

18. Локай Б. А. Зміни вмісту метаболітів гліколізу в крові, інкубованій з отрутою блідої поганки і пеніциліном / Б. А. Локай // Мед. хім. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 51–53.

19. Локай Б. А. Інтенсивна терапія отруєнь блідою поганкою / Б. А. Локай, О. І. Куйбіда, Є. М. Стародуб // Шпитальна хірургія. – 2000. – №4. – С.124 –126.

20. Марущак М.І. Особливості патогенетичних механізмів ендогенної інтоксикації та гуморального імунітету при експериментальному гострому ураженні легень / М.І. Марущак // Вісник наукових досліджень. – 2011. – № 3. – С. 108-111.

21. Методи дослідження ендогенної інтоксикації організму: методичні рекомендації / М. А. Андрейчин, М. Д. Бех, В. В. Дем'яненко [та ін.]. – К., 1998. – С. 10–13.

22. Мещишен І.Ф. Метод визначення окиснювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І.Ф.Мещишен // Бук. мед. вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156-158.

23. Проблеми діагностики, профілактики та лікування екзогенних та ендогенних інтоксикацій : Всеукр. наук.-практ. конф., 16-18 жовтня 2004 р. : тези доп. – Чернівці: Медик, 2004. – 128 с.

24. Самохіна Л. М. Система протеїназа-інгібітор протеїназ в оцінці вазоконстрикторних і апоптогенних змін у хворих на хронічну хворобу

нирок / Л. М. Самохіна, І. І. Топчій, А. О. Несен // Укр. журн. нефрол. та діалізу. – 2008. – Т. 17, № 1. – С. 33–37.

25. Самохіна Л. М. Система протеїназа – інгібітор протеїназ в оцінці вазоконстрикторних і апоптогенних змін у хворих на хронічну хворобу нирок / Л. М. Самохіна, І. І. Топчій, А. О. Несен // Укр. журнал нефрології та діалізу. – 2008. – Т. 17, № 1. – С. 33–37.

26. Трубич Н.Я. Динаміка показників ендогенної інтоксикації у щурів за умов гострого отруєння парацетамолом на тлі хронічного ураження солями кадмію та свинцю / Н.Я. Трубич, І.Я. Криницька // Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина». – Вип. 39. – 2010. – С. 31–34.

27. Савчук О.М. Вивчення білок-білкових взаємодій у системі гемостазу з використанням методу ензим-електрофорезу. / Савчук О.М. // Медична хімія. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 60-67.

28. Сопель О. М. Роль порушень вільнорадикальних процесів та ендогенної інтоксикації у патогенезі ураження нирок отрутою блідої поганки та їх корекція : автореф. дис. на здобуття наук ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.04 «Патологічна фізіологія» / О. М. Сопель. – Тернопіль, 2004. – 20 с.

29. Сопель О. М. Характеристика нефротоксичного впливу аманіта-фаллоїдинового токсину / О. М. Сопель // Клінічна та експериментальна патологія. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 448–449.

30. Структурно-гістохімічна характеристика печінки при аманіта-фаллоїдиновому отруєнні / Р. Є. Нечай, М. Я. Яковенко, А. Л. Локай [и др.] // Вплив субекстремальних факторів на організм людини і тварин : зб. статей. – Тернопіль, 1994. – С. 70–73.

31. Тофан І. П. Особливості перебігу синдрому ендогенної інтоксикації при післяінфарктному синдромі / І. П. Тофан // Медична хімія. – 2005. – № 3. – С. 36–39.

32. Acute pancreatitis possibly due to arginine use: a case report / M. Saka, A. Tuzun, Y. Ates [et al.] // *Turk J Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 15, № 1. – P. 56–58.
33. Alpha-1-antitrypsin polymerization: a fluorescence correlation spectroscopic study / P. Purkayastha, J. W. Klemke, S. Lavender [et al.] // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, № 7. – P. 2642–2649.
34. Alpha-2-Macroglobulin inhibits the malignant properties of astrocytoma cells by impeding beta-catenin signaling / Lindner I. [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 277–287.
35. Berger K.J. Mycotoxins revisited: part I / K. J. Berger, D. A. Guss // *Journal of Emergency Medicine.* – 2005. – Vol. 28, № 1, P. 53-62.
36. Birkenmeier G. Targetting the proteinase inhibitor and immune modulatory function of human alpha-2-macroglobulin / G. Birkenmeier // *Mod. Asp. Immunobiol.* – 2001. – Vol. 3. – P. 32–36.
37. Bonetti T. Increased penetration of amantine into hepatocytes when conjugated with albumin / T. Bonetti, M. Derensim, L. Flume // *Arch. Toxicol.* – 1976. – Vol. 35. – P.69–73.
38. Lipska A. Clinical consequences and diagnosis of congenital alpha-1-antitrypsin deficiency / A. Lipska, J. Wysocka // *Przegl. Lek.* – 1998. – Vol. 55, № 10. – P. 537–541.
39. Poisonous mushrooms; a review of the most common intoxications / A. D. L. Lima, R. Costa Fortes, M. R.C. Garbi Novaes [et al.] // *Nutr. Hosp.* – 2012. – Vol. 27, № 2. – P. 402–408.
40. Structural basis of transcription inhibition by α -amanitin and implications for RNA polymerase II translocation // Florian Brueckner & Patrick Cramer *Nature Structural & Molecular Biology.* – 2008. – Vol. 15. – P. 811–818.
41. Visegrady B. The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments / B. Visegrady // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 565, № 1-3. – P. 163–166.

42. Wieland T. CRC Crit. / T. Wieland, H. Faulstich // Rev. Biochem. – 1978. – Vol. 5. – P. 185–260.
43. Wieland T. Die Konstitution von Amanitin und Amanullin / T. Wieland, A. Buku // Libb. Ann. Chem. – 1968. – Vol. 713. – P. 215–220.
44. Wieland T. Fifty Years of Amanitin / T. Wieland // Experientia. – 1991. – Vol. 47. – P. 1186–1193.
45. Wieland T. Poisonous Principles of Mushrooms of the Genus Amanita T. Wieland // Science. – 1968. – Vol. 159, № 3818. – P. 946–952.
46. Wieland H. Uber die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. VI. Amanitin, das Hauptgift des Knollenblätterpilzes / H. Wieland, R. Hallermayer // Liebig's Ann. Chem. – 1941. – №. 548. – P. 1-18.
47. Wong J. H. Toxins from Basidiomycete fungi (mushroom): amatoxins, phallotoxins and virotoxins / J. H. Wong, T. B. Ng. // Handbook of Biologically Active Peptides. – 2016. – Vol. 2. – P. 131–135.
48. Xue Q. Gong. α -Amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II / Xue Q. Gong, Yuri A. Nediakov, Zachary F. Burton // J. Biol. Chem. – 2004.– Vol. 279, № 26. – P. 27422–27427.
49. Zeeh J. The aging liver: structural and functional changes and their consequences for drug treatment in old age / J. Zeeh, D. Platt // Gerontology. – 2012. – V. 48, № 3. – P. 121–127.