

PACS numbers: 81.16.Fg, 82.70.Dd, 87.16.D-, 87.16.Tb, 87.19.Ff, 87.64.Dz, 87.64.M-

Морфологічні зміни в ішемізованих м'язових волокнах *musculus soleus* за хронічної алкоголізації тварин та використання водного колоїдного розчину C₆₀-фуллеренів

О. П. Мотузюк¹, Д. М. Ноздренко², К. І. Богущька², О. В. Ременяк³,
Ю. І. Прилуцький²

¹Східноєвропейський національний університет ім. Лесі Українки,
просп. Волі, 13,
43025 Луцьк, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64,
01601 Київ, Україна

³Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова,
вул. Пирогова, 56,
21018 Вінниця, Україна

Проаналізовано морфологічні особливості ішемізованих м'язових волокон *musculus soleus* щурів за хронічної алкоголізації їх і терапевтичного впливу водного колоїдного розчину C₆₀-фуллеренів на ступінь вираженості патоморфологічних змін у такому м'язі. Встановлено, що камбалоподібний м'яз, у якому переважають волокна повільного типу, є стійким до ішемічних пошкоджень легкого ступеня. Зі збільшенням тривалості ішемізації у м'язі поступово виникають патологічні зміни, зокрема зменшення розмірів волокон, розширення інтерстиціального простору, збільшення кількості фібробластів, втрата поперечної посмугованості, поява хвилеподібних випинів на мембрані, а також чітко проявляються ознаки некрозу. За терапевтичного введення щурам водорозчинних C₆₀-фуллеренів, які є потужними антиоксидантами та здатні ефективно поглинати вільні радикали, м'язи проявляли тривалу резистентність до ішемічної агресії. Одержані результати можуть бути використані у медичних нанотехнологіях для оцінки та подальшої терапії ішемічних травм скелетних м'язів людини.

The morphological features of ischemic muscle fibres of *musculus soleus* of rats at their chronic alcoholization and therapeutic effect of C₆₀-fullerene aqueous colloidal solution on the severity level of pathomorphological changes in such a muscle are analysed in detail. As shown, the soleus muscle, in which fibres of the slow type prevail, is resistant to mild ischemic damage. With an increase in the duration of ischemia, pathologi-

cal changes gradually arise in the muscle, in particular, a decrease in fibre size, expansion of the interstitial space, an increase in the number of fibroblasts, loss of transverse banding, appearance of wavelike bends on the membrane, and signs of necrosis clearly manifest. With the therapeutic *in vivo* administration of water-soluble C₆₀-fullerenes, which are powerful antioxidants and are able to absorb free radicals effectively, muscles showed long-lasting resistance to ischemic aggression. Results obtained can be used in medical nanotechnologies for the assessment and subsequent therapy of ischemic injuries of human skeletal muscles.

Проанализированы морфологические особенности ишемизированных мышечных волокон *musculus soleus* крыс при хронической алкоголизации их и терапевтическом воздействии водного коллоидного раствора C₆₀-фуллеренов на степень выраженности патоморфологических изменений в такой мышце. Показано, что камбаловидная мышца, в которой преобладают волокна медленного типа, является устойчивой к ишемическим повреждениям лёгкой степени. При увеличении длительности ишемизации в мышце постепенно возникают патологические изменения, в частности уменьшение размера волокон, расширение интерстициального пространства, увеличение количества фибробластов, потеря поперечной полосатости, появление волнообразных изгибов на мембране, а также чётко проявляются признаки некроза. При терапевтическом введении крысам водорастворимых C₆₀-фуллеренов, которые являются мощными антиоксидантами и способны эффективно поглощать свободные радикалы, мышцы проявляли длительную резистентность по отношению к ишемической агрессии. Полученные результаты могут быть использованы в медицинских нанотехнологиях для оценки и последующей терапии ишемических травм скелетных мышц человека.

Ключові слова: ішемія, м'язові волокна *musculus soleus*, C₆₀-фуллерени, світлова мікроскопія.

Keywords: ischemia, muscle fibres *musculus soleus*, C₆₀-fullerenes, light microscopy.

Ключевые слова: ишемия, мышечные волокна *musculus soleus*, C₆₀-фуллерены, световая микроскопия.

(Отримано 21 лютого 2019 р.)

1. ВСТУП

Ішемія посмугованих скелетних м'язів — поширена патологія опорно-рухового апарату людини. Вона може виникати як ускладнення після різноманітних травматичних пошкоджень кінцівки, інфекцій, судинних патологій. М'язова тканина є найбільш чутливою до тривалої ішемії кінцівки, повна ішемізація якої упродовж 4–5 год. призводить до необоротних змін у м'язі та втрачає

скорочувальної активності, а також некротизації тканин, що потенційно може стати причиною не лише інвалідності, але й смерті потерпілого [1]. На відміну від гіпоксії — терміну, що визначає стан кисневого голодування окремих органів або організму загалом внаслідок порушень зовнішнього та внутрішнього (тканинного, клітинного) дихання, ішемія характеризується недостатністю кровопостачання та проявляється не лише локальною тканинною гіпоксією, але й іншими порушеннями метаболізму внаслідок недостатнього надходження поживних речовин (глюкози та ін.) [2].

Ішемія пошматованих м'язів є поліморфним явищем з різними ступенями та часом прояву, симптоматикою та динамікою, що нерідко маскується проявами інших патологічних процесів, в основі яких лежать зміни клітинного метаболізму. Наразі питання про перебіг ішемії, симптоми, якими вона супроводжується, є недостатньо вивченими. Ішемія-реперфузія залишається актуальною проблемою у сучасній хірургії, оскільки з цією патологією пов'язані висока захворюваність і смертність [3].

В основі пошкодження тканини за ішемії лежить її виснаження, втрата кисню й енергетичних субстратів, пошкодження клітин. Останнє супроводжується клітинним набряком і лізосомною дегрануляцією. Такі симптоми починають проявлятися вже після 30 хв. ішемії. Клінічні прояви ішемії досить складні та несистематизовані. Наразі вкрай актуальною є проблема відсутності точних діагностичних тестів для швидкого встановлення тяжкості ішемічної травми, що має вирішальне значення для ефективності подальшої її терапії [4], адже це — патологічний процес зі швидким розвитком у часі.

Хронічний алкоголізм призводить до дисфункцій скелетних м'язів, включаючи хворобливість та атрофію із супутньою втраченою м'язовою масою, зміною ходи та порушенням рухливості. Ці розлади класифікують як алкогольну міопатію; вони супроводжуються значними метаболічними та фізіологічними змінами у скелетних м'язах [5]. Алкогольна міопатія спостерігається у 40–60% випадків хронічних алкоголіків і зустрічається у п'ять разів частіше, ніж алкогольний цироз печінки [6].

Наразі актуальним є питання щодо дії різних природних та штучних антиоксидантів на м'язову тканину за ішемічної травми. Неабияку зацікавленість викликає новий клас біосумісних вуглецевих наноструктур — C_{60} -фуллеренів, яким притаманна унікальна біологічна активність і потужна антиоксидантна дія [7, 8]. Відомо, що саме вільні радикали є одним з основних патогенних чинників у процесі розвитку ішемічних пошкоджень м'язової тканини [9]. Проведений раніше біологічний скринінг водорозчинних немодифікованих C_{60} -фуллеренів на моделях *in*

vitro та *in vivo* показав, що за низьких концентрацій вони не виявляють гострих токсичних ефектів щодо нормальних клітин, є неімуногенними, неалергенними та здатні регулювати вільнорадикальні процеси у клітинах і тканинах організму, зокрема нейтралізувати надлишок вільних радикалів [10–14].

Отже, використання біодоступних C_{60} -фуллеренів, як потужних антиоксидантів, відкриває нові потенційні можливості для профілактики та корекції ішемічно-реперфузійних патологічних процесів у м'язовій тканині. Тому метою цього дослідження було проаналізувати морфологічні зміни ішемізованих м'язових волокон *musculus soleus* щурів за хронічної алкоголізації їх і терапевтичного впливу водорозчинних C_{60} -фуллеренів як ефективних поглиначів активних форм кисню (АФК), що сприяють розвитку ішемічних пошкоджень.

2. МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

2.1. Експериментальні групи тварин

Для дослідження були використані здорові щурі-самці лінії *Wistar* масою у 140–160 г. Протокол дослідження був затверджений комісією з питань біоетики СНУ ім. Лесі Українки, згідно з правилами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» і нормами біомедицинської етики, згідно із Законом України №3446-IV 21.02.2006 р. (м. Київ) «Про захист тварин від жорстокого поводження» з проведення медико-біологічних досліджень.

Тварини, відібрані для експерименту, були розділені на 5 експериментальних груп:

- інтактні тварини;
- алкоголізовані тварини з експериментально-індукованою ішемією тривалістю в 1 год.;
- алкоголізовані з експериментально-індукованою ішемією тривалістю в 1 год. та ентерогастральним введенням водного колоїдного розчину C_{60} -фуллеренів (C_{60} ФВР) упродовж 5 днів;
- алкоголізовані тварини з експериментально-індукованою ішемією тривалістю у 2 год.;
- алкоголізовані з експериментально-індукованою ішемією тривалістю у 2 год. та ентерогастральним введенням C_{60} ФВР упродовж 5 днів.

2.2. Анатомо-гістологічна характеристика *musculus soleus*

Для дослідження був обраний *musculus soleus* — повільний м'яз

із аеробним метаболізмом [15]; він є більш чутливим до ішемії, порівняно зі швидкими м'язами, зокрема *musculus gastrocnemius*. Така відмінність пояснюється перебігом метаболічних процесів у різних типах м'язових волокон: волокна типу II (анаеробні, швидкі), які переважають у складі *musculus gastrocnemius*, головним чином отримують енергію шляхом гліколізу, а волокна типу I (аеробні, повільні), яких у складі *musculus solvus* є приблизно 91%, отримують енергію переважно шляхом окислення гліцеридів та, меншою мірою, через глікогенний окислювальний шлях [15]. Функціонування повільних волокон істотно залежить від окисного фосфорилування, а отже, вони є більш чутливими до гіпоксії як наслідку ішемічних пошкоджень.

2.3. Модель індукції хронічної алкогольної інтоксикації

У літературі описано декілька варіантів відтворення моделю експериментально-індукованого алкоголізму у щурів. Нами було обрано методу Халілова–Закіхорджаєва [16], яка є найбільш зручною для індукції хронічної алкогольної інтоксикації у щурів завдяки ефективності способу введення тварині добового об'єму алкоголю та можливості легко його контролювати.

Згідно з цією методикою, упродовж 30 днів щурі один раз на добу отримували 40%-етиловий спирт (одержаний шляхом розведення 96%-етилового спирту («Біо-Фарма ЛТД», Україна) дистильованою водою) з розрахунку 2 мл/100 г маси тіла тварини. Для визначення середнього індивідуального добового об'єму алкоголю тварин зважували 1 раз на тиждень кантерною електронною вагою-безменом WH-A08. Для введення 40%-етилового спирту використовували металевий катетер.

Тварини з контрольної інтактної групи аналогічним чином отримували еквівалентний об'єм дистильованої води.

2.4. Методика введення водного колоїдного розчину C₆₀-фуллеренів

Для одержання C₆₀ФВР було застосовано методу, яка ґрунтується на переведенні молекул C₆₀-фуллерену з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком [17, 18]. Для цього змішували насичений розчин чистого C₆₀-фуллерену в толуолі (чистота > 99,5%), де його концентрація відповідає максимальній розчинності $\cong 2,9$ мг/мл, та однаковий об'єм дистилату у відкритому стакані. Дві утворені водні фази піддавали дії ультразвуку. Процедуру виконували до повного випаровування толуолу та набуття водною фазою жовтого забарвлення. Фільтрацією водного розчину відділяли потрібний продукт від нерозчиненого C₆₀-фуллерену.

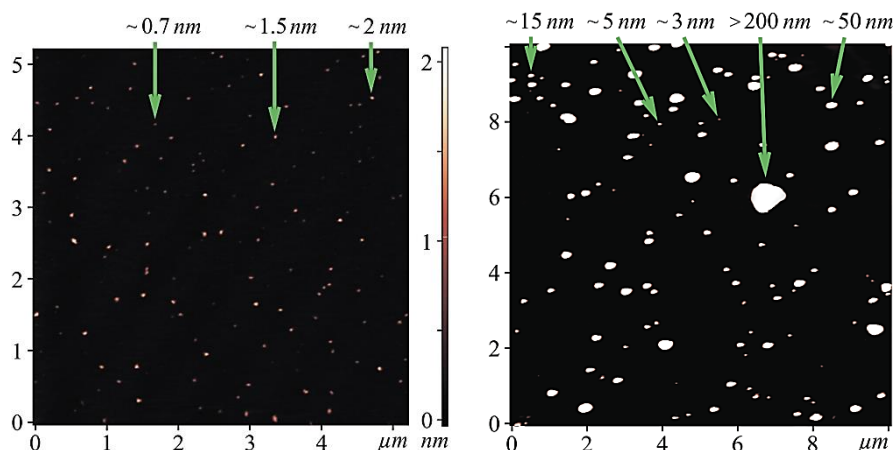


Рис. 1. АСМ-зображення частинок C_{60} -фуллерену на поверхні слюди, осаджених з C_{60} ФВР за концентрації у 0,15 мг/мл. *Примітка:* стрілки показують висоту окремих частинок.¹

За допомогою цієї методи вдається одержати різні його концентрації у воді — від 0,01 до 2,6 мг/мл. Одержаний C_{60} ФВР є типовим колоїдним розчином, який містить як поодинокі молекули C_{60} ($\cong 0,7$ нм), їхні наночастинки, так і агрегати розміром у понад 200 нм (рис. 1 — дані атомно-силової мікроскопії (АСМ)). Крім того, він виявився стабільним упродовж 6–8 місяців за кімнатної температури.

C_{60} ФВР дозою у 1 мг/кг вводили ентерогастрально упродовж 5 останніх днів алкоголізації перед ішемізацією м'яза. Така технологія введення тваринам C_{60} ФВР упродовж 5 днів ґрунтується на тому, що C_{60} -фуллерени, яких вводили перорально щурам (доза — 500 мг/кг), виводилися з організму впродовж 2–4 діб. Вибрана доза ґрунтується на попередньо встановлених даних [19]. Варто лише зазначити, що використана в експериментах доза C_{60} -фуллерену є значно нижчою за значення LD_{50} , яка за перорального введення щурам становила 600 мг/кг ваги тіла [10].

2.5. Модель індукції ішемії

Хірургічні маніпуляції. Усі хірургічні процедури проводили в асептичних умовах під загальною анестезією. Наркотичний сон у щурів ініціювали тіопенталом натрію ('ARTE-RIUM', Україна) дозою у 50 мг/кг після попередньої премедикації 0,1%-атропіном ('ДЗ ГНЦЛС', Україна) для запобігання виникненню паралітичної асфіксії (0,1 мл за 30 хв. перед введенням у наркотичний сон). Передні та задні кінцівки тварини фіксували еластичними

пов'язками, прикріпленими до ротаційних важелів операційного столу.

Експериментальну індукцію ішемії здійснювали через 30 днів після початку хронічної алкоголізації шляхом перетискування джгутом зовнішньої клубової артерії (*arteria iliaca externa*), стегнової артерії (*arteria femoralis*) та її каудальних терміналей на рівні гомілки. Тривалість ішемії у щурів в обох дослідних групах становила 1 та 2 год. відповідно.

Під час препарування м'язові масиви гомілки зволожували 0,9%-ізотонічним розчином NaCl ($37 \pm 1^\circ\text{C}$). Після проведення усіх оперативних втручань рану зашивали і дезінфікували 5%-спиртовим розчином йоду. Після завершення експерименту тварини були піддані евтаназії шляхом введення критичної дози тіопенталу натрію (0,7 мг/100 г).

Для очищення від залишків фасціальної сполучної тканини м'яза використовували пінцети та ножиці. Маніпуляцію здійснювали під стереомікроскопом Brunel IMX Zoom Trinocular. М'язовий препарат промивали 0,9%-ізотонічним розчином NaCl ($37 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.6. Методика світлової мікроскопії

Досліджувані зразки м'язів фіксували у 10%-формаліні за кімнатної температури упродовж двох тижнів, після чого — додатково 10 днів у 7%-формаліні. Для звільнення від фіксатора зразки промивали під струменем проточної води упродовж 24 год. Потім матеріал зневоднювали. Для цього використовували спирти зростаючих концентрацій: 60% — 6 год., 70% — 6 год., 80% — 6 год., 90% — 4 год., 100% — 2 год. Як правило, матеріал перебував у спирті не менше 24 год., оскільки повне зневоднення — найважливіша умова успішної заливки.

Після зневоднення досліджуваний матеріал перебував 30 хв. у суміші 100%-спирту та ксилолу (1:1). Далі його переносили в ортоксилол на 20 хв., а згодом поміщали у насичений розчин парафіну в ортоксилолі за температури у 37°C на 30 хв. Після цього зразки м'язів поміщали на 12 год. у чистий парафін у термостат за температури у 56°C . Для приготування зрізів заливали матеріал чистим парафіном у формочки з паперу, охолоджували у воді та вирізали блок, який наклеювали розтопленим парафіном на дерев'яний кубик.

Блоки різали у горизонтальній площині на санному мікротомі (МС-2) товщиною у 10–15 мкм під кутом у 15° . Для ліпшого приклеювання парафінових зрізів предметні скельця змазували сумішшю білка з гліцерином, після чого нагрівали над полум'ям спиртівки та поміщали у термостат з температурою у 37°C на 24 год.

З одержаних зрізів за допомогою ксилолу видаляли парафін. Для цього зрізи поміщали на 3 хв. у ксилол, де відбувалося розчинення парафіну. Після розчинення парафіну препарати переносили у 100%-спирт на 2 хв., а потім також поміщали у 90%-, 80% - і 70%-спирт на 2 хв. і, нарешті, у дистильовану воду.

Фарбували зрізи розчином гематоксиліну Гарріса та пікрофуксином за методом Ван-Гізона і заливали у полістерол. Ця методика уможливує виявити колагенові елементи сполучної тканини, які зафарбовуються у червоний колір і виділяються на тлі інших тканинних елементів, забарвлених у яскраво-жовтий колір [20].

Гістологічні препарати фотографували за допомогою цифрової камери SEO мікроскопу Axioskop-40 (Carl Zeiss). Морфометричні показники (товщину м'язового волокна та величину міжфібрилярного простору) оцінювали з використанням комп'ютерної програми «ВідеоТест Морфологія 5.0».

Статистичну аналізу результатів мірвання здійснювали методами варіаційної статистики у програмі Statistica 10.0 (Statsoft Inc., США). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували Ст'юдентів t -критерій. Вірогідними вважалися відмінності за $p \leq 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після 1 год. ішемізації м'яза гістологічна картина у групі алкоголізованих тварин з ентерогастральним введенням C_{60} ВФР (рис. 2, в) практично не відрізнялася від м'язів контрольної групи (рис. 2, а). Зокрема, зберігається типова для скелетних м'язів поперечна посмугованість з правильним розташуванням саркоме-

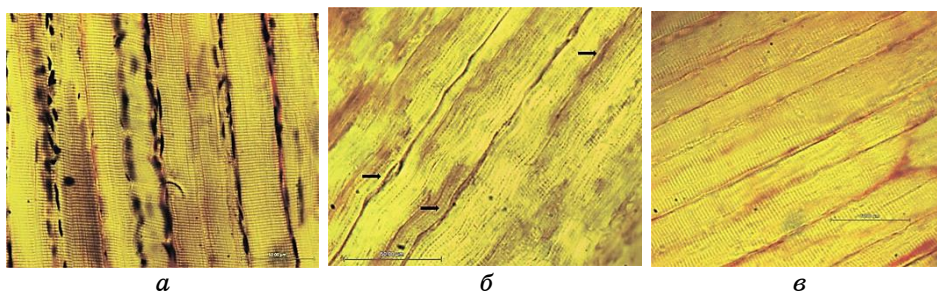


Рис. 2. М'язові волокна *musculus soleus* щура. Зафарбовування за Ван-Гізона, збільшення у 400 разів. а — контрольна група; б — група хронічно алкоголізованих тварин після ішемії тривалістю в 1 год.; в — група хронічно алкоголізованих тварин після ішемії тривалістю в 1 год. й ентерогастрального введення C_{60} ВФР. Примітка: стрілками показано порушення гладкості мембран, поява хвилеподібних випинів і ум'ятин.²

рів у м'язах. Численні ядра розміщуються під сарколемою м'язового волокна на периферії, а тому їх добре видно під мікроскопом. Мембрана м'язових волокон є гладенькою, без характерних випинів і ум'ятин, які спостерігали за ішемії тривалістю в 1 год. (рис. 2, б). Форма міоцитів не зазнала деформацій, мембрани цілісні, без видимих розривів і, як наслідок, виходу ядер у міжклітинний простір, на відміну від групи тварин з ішемією тривалістю в 1 год. Прошарок сполучної тканини (ендомізій) — як у здорового м'яза.

Ішемія м'яза тривалістю в 1 год. призводить до вірогідного пониження товщини м'язових волокон і зростання міжфібрилярного простору, порівняно з нативним м'язом. Проте, за використання S_{60} ФВР ці зміни не є вірогідними, порівняно з контрольною групою.

Так, середня товщина м'язового волокна у нативному *musculus soleus* становить $26,69 \pm 3,95$ мкм, після 1 год. ішемії без впливу S_{60} ФВР — $22,79 \pm 0,96$ мкм ($p < 0,05$), а в ішемізованих м'язах за ентерогастрального введення S_{60} ФВР — $24,56 \pm 2,95$ мкм. Крім того, за дії S_{60} ФВР товщина міжфібрилярного простору перебуває на рівні контрольних значень і становить $3,48 \pm 1,04$ мкм. У нативному м'язі цей показник дорівнює $13 \pm 1,44$ мкм, а після ішемії тривалістю в 1 год. зростає до $5,7 \pm 2,1$ мкм ($p < 0,05$), порівняно з контролем (рис. 3).

Отже, одержані результати вказують на виражений протекторний ефект S_{60} ФВР щодо морфологічних змін м'язових волокон камбалоподібного м'яза хронічно алкоголізованих щурів за ішемії тривалістю в 1 год. Зокрема, зберігаються типова для скелетних м'язів поперечна посмугованість, товщина волокон м'язової тканини та розмір міжфібрилярного простору, форма клітин і цілісність мембран без видимих розривів із наступним виходом ядер у міжклітинний простір, прошарок сполучної тканини помірної величини без видимого набряку; або ж ці зміни були незначними, порівняно з контрольною групою.

Гістологічна картина м'язових волокон *musculus soleus* щурів після 2 год. ішемії за дії S_{60} ФВР характеризується більш вираженими змінами, ніж за ішемії тривалістю в 1 год.

Зокрема, у частини м'язових волокон спостерігається втрата структурної цілісності у вигляді випинань мембрани (рис. 4, в), що пов'язане зі змінами компонентів жорсткості клітини (цитоскелета). У цьому випадку ішемічний процес викликає незначні дегенеративні зміни, порівняно з контролем (рис. 4, а).

Рівень порушень є візуально меншим, аніж у групі без впливу S_{60} ФВР (рис. 4, в). Загалом прослідковується компактне та впорядковане розташування м'язових волокон у пучках; ядра міофібрил розташовані на периферії клітин. На окремих ділянках порушується-

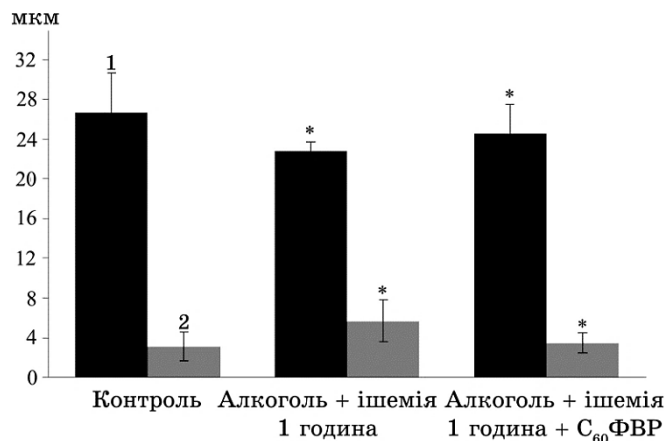


Рис. 3. Товщина м'язового волокна (1) і розмір міжфібрилярного простору (2) у *musculus soleus* хронічно алкоголізованих щурів за ішемії тривалістю в 1 год. та дії С₆₀ФВР. Примітка: * вірогідні відмінності, порівняно з контролем ($p < 0,05$).³

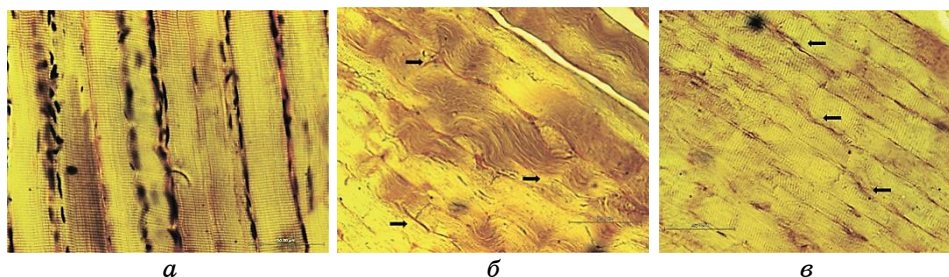


Рис. 4. М'язові волокна *musculus soleus* щура. Зафарбовування за Ван-Гізон, збільшення у 400 разів. *a* — контрольна група; *b* — група хронічно алкоголізованих тварин після ішемії тривалістю у 2 год.; *в* — група хронічно алкоголізованих тварин після ішемії тривалістю у 2 год. за ентерогастрального введення С₆₀ФВР. Примітка: стрілками показано порушення гладкості мембран, поява хвилеподібних випинів і ум'ятин.⁴

ся типова для скелетних м'язів поперечна посмугованість.

Морфометрична аналіза виявила, що в ішемізованому м'язі за дії С₆₀ФВР відбувається незначне зменшення товщини волокон і збільшення міжфібрилярного простору.

Так, товщина м'язових волокон у групі хронічно алкоголізованих щурів за ішемії тривалістю у 2 год. та дії С₆₀ФВР становить $23,84 \pm 3,01$ мкм (рис. 5). У нативному м'язі вона дорівнювала $26,69 \pm 3,95$ мкм, а у групі без впливу С₆₀ФВР — $19,41 \pm 1,46$ мкм. Товщина міжфібрилярного простору становить $4,71 \pm 2,04$ мкм

(для порівняння у контрольній групі — $3,13 \pm 1,44$ мкм), а у групі тварин без впливу S_{60} ФВР — $7,01 \pm 2,13$ мкм ($p \leq 0,05$) (рис. 5).

Варто також зазначити, що за дії S_{60} ФВР (рис. 6, б) зустрічаються ділянки з фрагментацією на окремі елементи, як і в групі без його використання (рис. 6, а). Простори між окремими волокнами розширені внаслідок набряку ендомізію. Проте, кількість колагенових волокон у міжклітинному просторі є незначною.

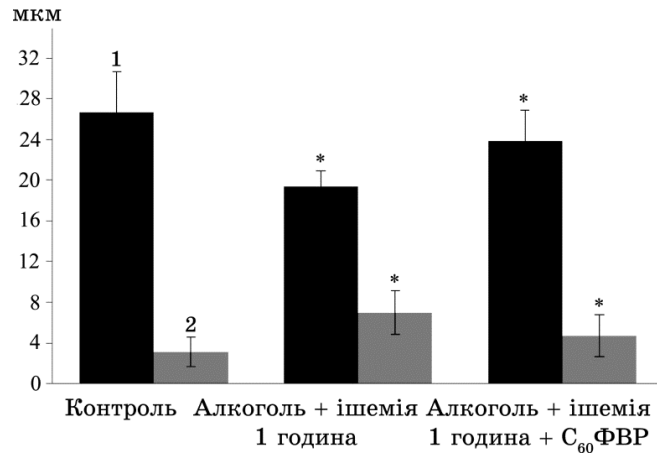


Рис. 5. Товщина м'язового волокна (1) і розмір міжфібрилярного простору (2) у *musculus soleus* хронічно алкоголізованих щурів за ішемії тривалістю у 2 год. і дії S_{60} ФВР. Примітка: * вірогідні відмінності, порівняно з контролем ($p \leq 0,05$).⁵

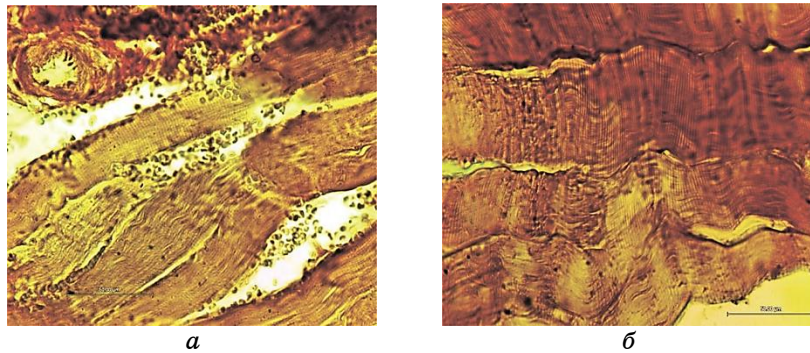


Рис. 6. М'язові волокна *musculus soleus* щура. Зафарбовування за Ван-Гізон, збільшення у 400 разів. а — група хронічно алкоголізованих тварин після ішемії тривалістю у 2 год.; б — група хронічно алкоголізованих тварин після ішемії тривалістю у 2 год. та ентерогастрального введення S_{60} ВФР.⁶

Ознаки запального процесу виражені меншою мірою, порівняно з групою без введення C_{60} ФВР (рис. 6, а): навколо пошкоджених волокон великої кількості фагоцитів не спостерігається, що свідчить про незначний розвиток некротичного процесу. Більша частина волокон зберігає свою цілісність і, як наслідок, кількість ядер і фрагментів зруйнованих волокон у міжклітинному просторі значно менша (рис. 6, б), ніж у групі без дії C_{60} ФВР.

Отже, одержані експериментальні дані вказують на виражений захисний ефект C_{60} ФВР щодо розвитку патоморфологічних змін м'язових волокон за ішемії тривалістю у 2 год. Водночас, за дії C_{60} ФВР гістологічна картина характеризується порушеннями, порівняно з контрольною групою. Зокрема, мають місце незначні порушення типової поперечної посмугованості, пониження товщини м'язових волокон і збільшення розміру міжфібрилярного простору, зміни у топології клітинних мембран із незначними розривами, незначний набряк сполучнотканинних оболонок м'язової тканини і, як наслідок, розмежування м'язових волокон. Запальний процес виражений меншою мірою.

Загалом, результати проведених досліджень виявили прогресуючі патоморфологічні зміни у м'язових волокнах *musculus soleus* хронічно алкоголізованих щурів за ішемічного пошкодження тривалістю в 1 та 2 год. Їхніми першочерговими ознаками є: порушення типової для скелетних м'язів поперечної посмугованості, що може бути пов'язано з ультраструктурними змінами структури Z-дисків саркомерів; спостережувані порушення гладкості мембран міоцитів з утворенням хвилеподібних вигинів і ум'ятин, що пояснюється змінами компонентів жорсткості клітин (цитоскелета); характерне розділення м'язових волокон, що зумовлено набряком елементів сполучної тканини (ендомізію та перимізію); фрагментація клітинних мембран м'язових волокон призводить до виходу ядер у міжклітинний простір і витоку рідини, що зменшує товщину м'язових волокон і збільшує розмір міжфібрилярного простору.

Пролонгована ішемія веде до накопичення колагенових структур у ділянках міофібрил, які розділилися, що свідчить про збільшення фібробластів, які їх продукують. У міжклітинному просторі спостерігається велика кількість дрібних елементів фрагментованих міоцитів, а також фагоцитів, що є проявом запальних процесів і некрозу м'язових волокон.

Зазвичай, зміни морфології ішемізованих м'язів відбуваються у хронологічному порядку за функціональними порушеннями скорочувального апарату на біохемічному рівні. При цьому каскад патологічних процесів, які призводять до морфологічних змін, порівняно зі здоровими міозитами, і, як наслідок, порушення механокінетичних параметрів скорочення м'яза загалом,

запускається нестачею кисню, що веде до виснаження енергетичних запасів клітини. Результатом анаеробного метаболізму є значне підвищення рівня молочної кислоти, внаслідок чого змінюється внутрішньоклітинне значення рН. Закисленість середовища призводить до «збою» у функціонуванні йонних насосів. Надлишкова кількість фосфоліпаз робить клітинну мембрану міоцитів більш проникною для патогенних хемічних сполук. Після цього відбувається руйнування мітохондрій, наслідком чого є ще більше зростання кількості токсичних продуктів, зокрема АФК. Саме АФК сприяють розриву клітинних мембран, після чого усі токсичні речовини потрапляють у міжклітинний простір, внаслідок чого формується набряк тканин.

Результати проведених досліджень чітко вказують на значний захисний вплив S_{60} ФВР щодо розвитку патоморфологічних змін в ішемізованих м'язах. Це пов'язане з вираженими антиоксидантними властивостями молекул S_{60} . Ступінь патоморфологічних змін практично мінімізується у випадку ішемії тривалістю в 1 год. або ж є незначною у випадку ішемії тривалістю у 2 год. Пониження протекторного впливу S_{60} ФВР може бути пов'язане з надмірним утворенням АФК в ішемізованих скелетних м'язах, спричиненим синергічним впливом двох патологій.

Порушення перебігу біохемічних процесів, які виникають за ішемічного пошкодження на тлі алкогольної міопатії, проявляються і за гістологічної аналізи м'язових волокон. Літературні дані свідчать про значні структурні та морфологічні зміни м'язових волокон, причому ступінь тяжкості залежить від тривалості ішемії [21]. Загальна картина ішемічного пошкодження включає присутність м'язових волокон нерівномірної товщини з порушенням поперечної посмугованості, вираженою вакуолізацією, ознаками гіпертрофії та некротичних змін [22]. Характерною ознакою є виражений міжм'язовий набряк сполучнотканинної стромы. Ступінь пошкодження, зокрема некротичні зміни, зумовлено виснаженням АТФ. Загалом зазначено, що морфологічні зміни є наслідком клітинного некрозу й апоптозу. Основними характеристиками некрозу є набряк клітин і необоротний розрив плазматичної мембрани, а апоптозу — висихання клітин, пошкодження ДНК, конденсація хроматинів і фрагментація.

Результати проведених гістологічних досліджень узгоджуються з експериментальними даними інших авторів [22–24]. Так, було виявлено низку патоморфологічних змін м'язових волокон, ступінь яких відрізнявся зі збільшенням тривалості ішемії. Насамперед, спостерігали прогресуюче порушення типової для скелетних м'язів поперечної посмугованості. Можна припустити, що це пов'язане зі структурними змінами у саркомерах за ішемії, що зумовлені, перш за все, зміною гомогенності та паралельності

розташування Z-дисків, яка спричинюється зміною структури або функціонального стану структурних білків. Патологічні зміни на рівні Z-дисків ведуть до механічного руйнування скорочувального апарату міоцита за його функціонування. Важливо, що руйнація та сепарація з подальшим заміщенням сполучною тканиною продовжується навіть у стані спокою. Крім того, такі клітинні зміни посилюються на тлі алкогольної міопатії, яка також призводить до потовщення Z-ліній і дезорганізації міофібрил.

Характерні порушення гладкості мембран міоцитів і незначні розриви з наступним виходом ядер у міжклітинний простір свідчать про зміни компонентів жорсткості клітини, а саме, цитоскелета. Розпад і деградацію структурних білків цитоскелета пояснюють підвищеною активністю фосфоліпаз і протеаз, які активуються високою концентрацією внутрішньоклітинного Ca^{2+} [23]. Крім того, накопичення внутрішньоклітинного Ca^{2+} може привести до необоротного пошкодження цілісності мембран міоцитів шляхом пониження клітинних ферментів, що сприяє запаленню та загибелі клітин шляхом некрозу й апоптозу [24]. Також є дані про те, що тканинно-руйнівні ефекти ураження опосередковуються АФК (H_2O_2 , O_2^- , OH^\cdot), які пошкоджують клітинні компоненти, що призводить до загибелі клітин шляхом некрозу. Одним з механізмів, за допомогою яких вільні радикали викликають пошкодження тканин, є взаємодія гідроксильного радикала з атомами Гідрогену метильних груп поліненасичених жирних кислот. Цей процес ініціює перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) мембран, що, в свою чергу, веде до негерметичності клітинної мембрани й у поєднанні з пониженням активного йонного екструдування, викликаного виснаженням АТФ, підвищує проникність клітинних мембран, спричинює клітинний набряк і накопичення рідини в інтерстиціальному просторі.

Спостерігали також зменшення товщини м'язових волокон і розділення їх, збільшення міжфібрилярного простору. Зі збільшенням тривалості ішемії були видимі ознаки початку запального процесу. Відокремленню м'язових волокон може сприяти набряк сполучної тканини, зокрема ендомізій. Водночас він містить гістоцити, розміщені дифузно та біля міоцитів. Набряклий перимізій містить запалені клітини у незначній кількості. Збільшення тривалості ішемічного процесу, дегенерація, некроз і атрофія міоцитів сприяють інфільтрації фагоцитів (макрофагів і нейтрофілів), які локалізуються навколо зони некрозу та здійснюють фагоцитоз і лізис некротизованої м'язової тканини, внаслідок чого зменшується площа перерізу м'язових волокон [25]. Активовані нейтрофіли можуть пошкоджувати ендотелій і підвищувати проникність ендотеліально-клітинного моношару внаслідок продукування низки АФК, включаючи O_2^- , H_2O_2 й OH^\cdot .

радикали. Водночас, алкогольна міопатія призводить до зменшення діаметра поперечного перерізу м'язових волокон до 20% без зміни їх кількості. При цьому метаболічно-активні компартменти міоцитів не пошкоджуються, але мають ознаки гіпертрофії.

Загалом, зростання патоморфологічних змін і недостатність показників силової відповіді м'яза зі збільшенням тривалості ішемії зумовлене продукуванням АФК. Утворення АФК особливо впливає на мембранні системи сарколеми та мітохондрій. Ймовірно, що виражений патогенний вплив АФК на скелетні м'язи є результатом синергічної дії окремих джерел. Така дія АФК проявляється у пошкодженні мембран та проникності їх, нефункціональному утворенні білків і мутації ДНК. Ці зміни відповідають за дифузю білків, ферментів та рецепторів, жорсткість мембран та проникність їх, а також уможливають загибель клітин.

Важливе місце у патогенезі надмірного впливу вільних радикалів належить пониженню активності антиоксидантних ферментів, зокрема супероксид-дисмутази, глутатіонпероксидази та каталази, коензиму Q, аскорбінової кислоти, β -каротину, α -токоферолу тощо. Зазначимо, що, наприклад, активність глутатіонпероксидази є значно нижчою у гліколітичних, ніж окислювальних волокнах. Дія відомих антиоксидантів ґрунтується на тому, що одна молекула антиоксиданту нейтралізує один вільний радикал. При цьому достатньо складно визначити оптимальну терапевтичну дозу антиоксиданту для конкретного патологічного процесу.

У проведених експериментах, як антиоксидант, використовували водорозчинний C_{60} -фуллерен. Раніше нами було встановлено, що його захисний ефект знаходиться на рівні 15 і 20–23% щодо силової відповіді м'яза за внутрішньовенного та внутрішньом'язового введення ішемізованим щурам дози у 1–1,5 мг/кг [14].

Як зазначалося вище, ішемічне пошкодження призводить до утворення надмірної кількості вільних радикалів, які, в свою чергу, викликають морфологічні та фізіологічні зміни у м'язі. Насамперед, вони включають зміни мембранних структур міоцитів і кальційзалежних процесів під час скорочення м'яза. На нашу думку, молекулі C_{60} , в першу чергу, взаємодіють з вільними радикалами, що накопичуються у безпосередній близькості до клітинних мембран і спричиняють порушення їх. Відомо, що водорозчинні похідні C_{60} -фуллерену виявляють потужний захисний ефект, аніж природний антиоксидант вітамін E, на процеси ПОЛ [26], а отже, сприяють збереженню цілісності мембрани. Підтримка цілісності мембран (а отже, трансмембранного потенціалу) є важливою для скорочувальної активності клітин скелетних

м'язів. З іншого боку, завдяки майже сферичній формі, нанорозміру та гідрофобним властивостям C_{60} -фуллерени можуть проникати всередину клітин [27]. Так, вони здатні безпосередньо проникати в органели, в яких відбувається надмірне утворення вільних радикалів, зокрема в мітохондрії [28].

Можна припустити, що протекторний ефект C_{60} -фуллеренів зумовлений не лише здатністю пригнічувати процеси ПОЛ, але й частково впливати на перебіг запального процесу через макрофагічну ланку. Це опосередковано підтверджується тим, що за внутрішньовенного введення C_{60} ФВР спостерігали більш виражений протекторний вплив, ніж у випадку внутрішньом'язового введення [12].

4. ВИСНОВКИ

За ішемічного пошкодження на тлі алкогольної міопатії виявлено патоморфологічні зміни м'язових волокон з прогресуючим характером: порушення типової для скелетних м'язів поперечної посмугованості, деформацію міоцитів з порушенням гладкості їхніх мембран, пониження товщини м'язових волокон і зростання міжфібрилярного простору, міжклітинний набряк сполучної тканини, початок запального процесу, що свідчить про некротичні явища у тканині. Протекторний ефект водорозчинних C_{60} -фуллеренів проявляється у мінімізації цих порушень на ранній стадії ішемії або ж зменшенні їх у випадку ішемії тяжкого ступеня розвитку. Отже, одержані результати щодо протекторного впливу C_{60} ФВР можуть слугувати підґрунтям для розробки ефективної методики застосування антиоксидантної терапії на ранніх етапах ішемічного пошкодження скелетних м'язів людини.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. M. Murdock and M. M. Murdoch, *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, **29**, No. 2: 301 (2012); doi: 10.1016/j.cpm.2012.02.001.
2. S. K. Bortolotto, W. A. Morrison, and A. J. Messina, *J. Inflamm. (Lond.)*, **1**: 2 (2004); doi: 10.1186/1476-9255-1-2.
3. Z. Turyczi, P. Arányi, B. Lukáts, D. Garbaisz, G. Lotz, L. Harsányi, and A. Szijártó, *PLoS One*, **9**, No. 1: e84783 (2014); doi: 10.1371/journal.pone.0084783.
4. B. Erkut, A. Özyazıcıoğlu, B. S. Karapolat, C. U. Koçoğulları, S. Keles, A. Ateş, C. Gundogdu, and H. Kocak, *Drug. Target Insights*, **2**: 249 (2007).
5. J. Fernandez-Sola, V. R. Preedy, C. H. Lang, and E. Gonzalez-Reimers et al., *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **31**, No. 12: 1953 (2007); <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00530.x>.
6. R. Estruch, J. M. Nicolas, E. Villegas, A. Junque, and A. Urbano-Marquez,

- Alcohol Alcohol.*, **28**, No. 5: 543 (1993).
7. G. Didenko, S. Prylutska, Y. Kichmarenko, G. Potebnya, Y. Prylutsky, N. Slobodyanik, U. Ritter, and P. Scharff, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.*, **44**, Nos. 2–3: 124 (2013).
 8. I. V. Vereshchaka, N. V. Bulgakova, A. V. Maznychenko, O. O. Gonchar, Yu. I. Prylutsky, U. Ritter, W. Moska, T. Tomiak, D. M. Nozdrenko, I. V. Mishchenko, and A. I. Kostyukov, *Front. Physiol.*, **9**: 517 (2018); doi: 10.3389/fphys.2018.00517.
 9. T. J. Walters, K. Garg, and B. T. Corona, *Muscle Nerve*, **52**, No. 4: 640 (2015); doi: 10.1002/mus.24581.
 10. N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S. R. Wilson, and F. Moussa, *Nano Lett.*, **5**: 2578 (2005).
 11. S. V. Prylutska, I. I. Grynyuk, S. M. Grebinyk, O. P. Matyshevska, Yu. I. Prylutsky, U. Ritter, C. Siegmund, and P. Scharff, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.*, **40**, No. 4: 238 (2009).
 12. S. Yu. Zay, D. A. Zavodovsky, K. I. Bogutska, D. N. Nozdrenko, and Yu. I. Prylutsky, *Fiziol. Zh.*, **62**, No. 3: 66 (2016).
 13. M. Tolkachov, V. Sokolova, V. Korolovych, Yu. Prylutsky, M. Epple, U. Ritter, and P. Scharff, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.*, **47**, Nos. 2–3: 216 (2016).
 14. D. M. Nozdrenko, D. O. Zavodovskiy, T. Y. Matvienko, S. Y. Zay, K. I. Bogutska, Y. I. Prylutsky, U. Ritter, and P. Scharff, *Nanoscale Res. Lett.*, **12**: 115 (2017); doi: 10.1186/s11671-017-1876-4.
 15. A. Badhwar, A. A. Dungey, K. A. Harris, J. A. Scott, S. D. McCarter, J. R. Scott, T. L. Forbes, and R. F. Potter, *J. Surg. Res.*, **109**, No. 1: 62 (2003).
 16. M. H. Khalilov and Sh. Ya. Zakikhordzhayev, *Questions of an Alcoholism Clinic* (Tashkent: 1983).
 17. A. Golub, O. Matyshevska, S. Prylutska, V. Sysoyev, L. Ped, V. Kudrenko, E. Radchenko, Yu. Prylutsky, P. Scharff, and T. Braun, *J. Mol. Liq.*, **105**, Nos. 2–3: 141 (2003).
 18. U. Ritter, Yu. I. Prylutsky, M. P. Evstigneev, N. A. Davidenko, V. V. Cherepanov, A. I. Senenko, O. A. Marchenko, and A. G. Naumovets, *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.*, **23**, No. 6: 530 (2015).
 19. D. M. Nozdrenko, K. I. Bogutska, Yu. I. Prylutsky, V. F. Korolovych, M. P. Evstigneev, U. Ritter, and P. Scharff, *Fiziol. Zh.*, **61**, No. 2: 48 (2015).
 20. J. H. Bruce-Gregorios, *Histopathologic Techniques* (Philippines: Quezon City: 1974).
 21. E. M. Carmo-Araújo, M. Dal-Pai-Silva, V. Dal-Pai, and R. Cecchini, *Int. J. Exp. Pathol.*, **88**, No. 3: 147 (2007).
 22. C. Vaillancourt, I. Shrier, A. Vandal, M. Falk, M. Rossignol, and D. Somogyi, *Can. J. Emerg. Med.*, **6**, No. 3: 147 (2004).
 23. D. J. Marcinek, M. J. Kushmerick, and K. E. Conley, *J. Appl. Physiol.*, **108**, No. 6: 1479 (2010); doi: 10.1152/jappphysiol.01189.2009.
 24. B. Lu, K. Kwan, Y. A. Levine, P. S. Olofsson, H. Li, J. Yang, S. Joshi, H. Wang, U. Andersson, S. S. Chavan, and K. J. Tracey, *Mol. Med.*, **20**: 350 (2014); doi: 10.2119/molmed.2013.00117.
 25. K. Harris, P. M. Walker, D. A. Mickle, R. Gatley, G. J. Wilson, B. Kuzon,

- N. McKee, and A. D. Romanschin, *Am. J. Physiol.*, **250**: 213 (1986).
26. I. C. Wang, L. A. Tai, D. D. Lee, P. P. Kanakamma, C. K.-F. Shen, T. Y. Luh, Ch. H. Cheng, and K. C. Hwang, *J. Med. Chem.*, **42**, No. 22: 4614 (1999).
27. D. Franskevych, K. Palyvoda, D. Petukhov, S. Prylutska, I. Grynyuk, C. Schuetze, L. Drobot, O. Matyshevska, and U. Ritter, *Nanoscale Res. Lett.*, **12**: 40 (2017); doi: 10.1186/s11671-016-1819-5.
28. M. C. Tsai, Y. H. Chen, and L. Y. Chiang, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, No. 4: 438 (1997).

¹*Lesya Ukrainka Eastern European National University,
13, Volya Avenue,
UA-43025 Lutsk, Ukraine*

²*Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Volodymyrska Str., 64,
UA-01601 Kyiv, Ukraine*

³*National Pirogov Memorial Medical University,
56, Pirogov Str.,
UA-21018 Vinnytsia, Ukraine*

¹ Fig. 1. AFM image of C₆₀-fullerene particles deposited from the C₆₀FAS (concentration 0.15 mg/ml) onto a freshly cleaved atomic smooth surface of mica. *Note*: arrows indicate heights of individual particles.

² Fig. 2. Muscle fibres *musculus soleus* of a rat. Dyeing by Van Gizon, an increase of 400 times. *a*—a control group; *b*—a chronically alcoholised group of animals after ischemia lasting 1 h; *c*—a chronically alcoholised group of animals after ischemia lasting 1 h and enterogastric introduction of C₆₀FAS. *Note*: arrows indicate the violation of smoothness of membranes and appearance of wavelike bends.

³ Fig. 3. Muscle fibre thickness (1) and size of interfibrillar space (2) in *musculus soleus* chronically alcoholised rats for 1 h ischemia and C₆₀FAS action. *Note*: *—the significant differences compared to control ($p \leq 0.05$).

⁴ Fig. 4. Muscle fibres *musculus soleus* of a rat. Dyeing by Van Gizon, an increase of 400 times. *a*—a control group; *b*—a chronically alcoholised group of animals after ischemia lasting 2 h; *c*—a chronically alcoholised group of animals after ischemia lasting 2 h and enterogastric introduction of C₆₀FAS. *Note*: arrows indicate the violation of smoothness of membranes and appearance of wavelike bends.

⁵ Fig. 5. Muscle fibre thickness (1) and size of interfibrillar space (2) in *musculus soleus* chronically alcoholised rats for 2 h ischemia and C₆₀FAS action. *Note*: *—the significant differences compared to control ($p \leq 0.05$).

⁶ Fig. 6. Muscle fibres *musculus soleus* of a rat. Dyeing by Van Gizon, an increase of 400 times. *a*—a chronically alcoholised group of animals after ischemia lasting 2 h; *b*—a chronically alcoholised group of animals after ischemia lasting 2 h and enterogastric introduction of C₆₀FAS.