



## Гістологічні особливості волокон литкового м'яза щурів при ішемії та використанні C<sub>60</sub> фулеренів як антиоксидантів

Олександр Мотузюк, Ірина Дмитрук, Дмитро Мельничук

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна  
Адреса для листування: cmoplutsk@gmail.com

Отримано: 28.09.19; прийнято до друку: 20.12.19; опубліковано: 28.12.19

**Резюме.** Мета роботи – провести аналіз гістологічних змін у литковому м'язі за умов експериментальної ішемії різної тривалості, за умови внутрішньочеревного введення C<sub>60</sub> фулеренів як антиоксидантів. Експеримент реалізовано на щурах інбредної лінії *Wistar* масою 140–160 г. Виділено такі групи тварин: контрольна, тварини з ішемією (1, 2 та 3 год), тварини з ішемією (1, 2 та 3 год) та за умови внутрішньочеревного введення C<sub>60</sub> фулеренів. Гістологічну обробку тканини проводили за загально визнаною методикою, фарбували за методом Ван-Гізона. Проаналізовано морфологічні особливості ішемізованих м'язових волокон *musculus gastrocnemius* різної тривалості та терапевтичного впливу водного колоїдного розчину C<sub>60</sub> фулеренів на ступінь вираження патоморфологічних змін у такому м'язі. Встановлено, що литковий м'яз є стійким до ішемічних пошкоджень легкого ступеня за умов внутрішньочеревного введення C<sub>60</sub> фулеренів, які є потужними антиоксидантами та здатні ефективно поглинати вільні радикали. Проте дослідження показали, що зі збільшенням тривалості ішемічного ушкодження захисна дія фулеренів пропорційно зменшується до тривалості дії ішемії. Зокрема, простежується початкова тенденція до руйнації м'язових волокон, порушення цілісності мембрани, спостерігається заміщення м'язової тканини сполучною, розрив саркомерів, втрата поперечної посмугованості, відсутність ядер, гіперемія капілярного русла, а також відзначаються некротично-деструктивні зміни, які відбуваються через надлишок не інактивованих супероксид- і гідроксид-радикалів. Таким чином, проведене лабораторне дослідження може слугувати підґрунтям для розробки лікарських препаратів проти м'язових патологій, а також сприятиме розробці комплексної методики лікування раних етапів ішемічного пошкодження скелетних м'язів людини.

**Ключові слова:** ішемія, *musculus gastrocnemius*, C<sub>60</sub> фулерени, м'язові волокна, світлова мікроскопія.

## Histological features of rat muscle fibers under conditions of ischemia and used C<sub>60</sub> fullerenes as antioxidants

Oleksandr Motuziuk, Iryna Dmytruk, Dmytro Melnichuk

Lesja Ukrainka Eastern European National University, Lutsk, Ukraine  
Correspondence: cmoplutsk@gmail.com

**Abstract.** The purpose of the article was to analyze the histological changes in the *gastrocnemius* muscle under conditions of experimental ischemia of different duration and simultaneously administration of C<sub>60</sub> fullerenes as an antioxidant.

The experiment was conducted on inbred *Wistar* line rats weighing 140–160 g. The animals were divided in groups: control; animals with ischemia (1, 2 and 3 hours); control, animals with ischemia (1, 2 and 3 h), animals with ischemia (1, 2 and 3 h) and C<sub>60</sub> fullerenes administration. Unilateral vascular ischemia was induced by tourniquet ligating the main arteries. Histologic processing of the tissue was carried out according to standard histological methods, stained with Van Gison method. Morphometric indices (thickness of muscle fibers and the size of interfibrillary space) were measured using the VideoTest Morphology 5.0 program. The therapeutic effect of an aqueous colloidal solution of C<sub>60</sub> fullerenes on the level of pathomorphological changes in the test muscle was also analyzed. The *musculus gastrocnemius* is resistant to light ischemic damages under condition of

intraperitoneal administration of C60 fullerenes, which are potent antioxidants and are able to absorb free radicals effectively. However, studies have shown that with increasing the duration of ischemic damage, the protective effect of fullerenes decreases in proportion to the duration of ischemia. In particular, the initial tendency to the destruction of muscle fibers, the disturbance of the membrane integrity, the replacement of the muscle tissue by the connective tissue, the severance of sarcomeres, the loss of the transverse striated, the absence of nuclei, the hyperemia of the capillary duct are noted. Necrotic-destructive changes that occur due to the excess of no inactivated superoxide and hydroxide radicals also observed. Thus, the laboratory study can serve as a basis for the development of drugs for muscle pathologies, and will help to develop a comprehensive methodology for the treatment of early stages of ischemic damage to human skeletal muscle.

**Key words:** ischemia, C60 fullerenes, muscle fibers, light microscopy.

## ВСТУП

Ішемія посмугованих м'язів є поліморфним явищем з різними ступенями і часом прояву, симптоматикою і динамікою, що нерідко маскується проявами інших патологічних процесів, основою яких є зміни клітинного метаболізму. На сьогодні питання про ішемію та симптоми, якими вона супроводжується, є недостатньо вивченими і цікавлять багатьох науковців. Ішемія-реперфузія залишається проблемою, яка стоїть перед судинними хірургами, оскільки з цим синдромом пов'язані висока захворюваність і смертність. В основі пошкодження тканин при ішемії лежить виснаження тканини, втрата тканиною кисню та 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 і несистематизовані. Тому поза належною увагою залишається питання дослідження прикладних аспектів фізіології та біофізики скелетних м'язів, які б могли допомогти покращити методики діагностики та лікування м'язових патологій, що можуть бути спричинені ішемією різної тривалості [3]. Варто зазначити, що проблема ішемічних ушкоджень різних органів та тканини – одна з найактуальніших і недостатньо вивчених у медицині та біології, що зумовлено запитами клінічної медицини, де лікарям доводиться стикатися з ішемічним пошкодженням різних органів [1]. Незважаючи на ґрунтовне вивчення наслідків гіпоксії для багатьох органів і тканин, механізми ішемічних ушкоджень різноманітних клітин і можливість їх подальшої регенерації залишаються недостатньо дослідженими.

Основним патогенним чинником у процесі ішемічних ушкоджень м'язової тканини є вільні радикали. З метою терапії цих патологій у медицині широко застосовують вітаміни А, К, Е, С та мікроелементи цинк, мідь, залізо, селен і марганець як кофактори ферментів системи антиоксидантного захисту.

З огляду на вищезазначене, сьогодні значну зацікавленість викликає новий клас вуглецевих наноструктур – C<sub>60</sub> фулерени, якому притаманні унікальні фізико-хімічні властивості та біологічна активність. Фулерени виступають потужними поглиначами вільних радикалів, утворення яких відбувається при ішемічній травмі скелетних м'язів [2].

Під час ішемічного пошкодження спостерігається надмірна активація у м'язовій тканині процесів вільнорадикального перекисного окиснення та загальне зменшення роботи антиоксидантних систем організму. Враховуючи вищесказане, зазначимо, що вивчення ефективності застосування фулеренів у якості протектора вільних радикалів на ішемізовані скелетні м'язи є важливим питанням фізіології на сучасному етапі досліджень патологічних станів, пов'язаних із дисфункціями опорно-рухового апарату людини.

Мета дослідження – провести аналіз гістологічних змін у литковому м'язі щура за умов ішемії різної тривалості, за умови внутрішньочеревного введення C<sub>60</sub> фулеренів як антиоксидантів.

## МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводились на 34 статевозрілих самцях білих щурів лінії *Wistar*. Досліджувані щури були поділені на 4 групи: контроль-I (n=3) – нативний *m.gastrocnemius*, контроль-II (n=3) – *m.gastrocnemius*, за умови внутрішньочеревного введення водного колоїдного розчину C<sub>60</sub> фулеренів упродовж 5 днів, та експериментальну (n=28). Так само експериментальна група була розділена на 4 підгрупи (по 7 тварин у кожній) з експериментально-індукованою унілатеральною васкулярною ішемією м'язів задніх кінцівок різної тривалості.

Протокол експерименту був затверджений комісією з питань біоетики СНУ імені Лесі Українки відповідно до правил "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що

використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, 1986). Дослідження проходило у дві фази: хронічний та гострий експеримент.

*Водний колоїдний розчин C<sub>60</sub> фулеренів* (концентрація 0,15 мг/мл) – доза 1 мг/кг – вводили перорально протягом 5 днів.

*Модель індукції ішемії.* Експериментальна унілатеральна васкулярна ішемія, тривалістю 1 год, 2 год, 3 год, індукувалася шляхом перетискування джгутом основних магістральних артерій стегна [3].

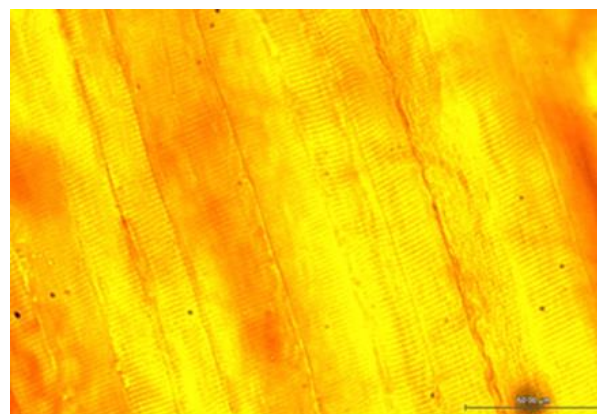
*Гістологічна підготовка та фарбування зрізів.* Досліджувані зразки м'язів фіксували в 10% формаліні, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, заливку матеріалу проводили в гомогенізовану парафінову суміш фірми «Histomix». Різання блоків проводили серійно уздовж та впоперек волокон на санному мікротомі (МС-2) товщиною 10 та 15 мкм. Фарбування м'язової тканини виконували за методом Ван-Гізона (гематоксилін Майєра, пікрофуксин) та поміщали в полістерол. Препарати розглядали під мікроскопом із загальним збільшенням у 100 та 400 разів [9]. Фотографували за допомогою цифрової камери SEO на мікроскопі Axioskop-40 (Carl Zeiss). Морфометричні показники (товщину м'язового волокна та величину міжфібрилярного простору) вимірювали за допомогою програми «ВідеоТест Морфологія 5.0».

*Статистичний аналіз* усіх результатів здійснювали за методами варіаційної статистики в програмі Statistica 10.0. («Statsoft Inc.», США). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважалися відмінності при  $p \leq 0,05$ . Результати представлено як середнє арифметичне  $\pm$  похибка середнього ( $M \pm m$ ).

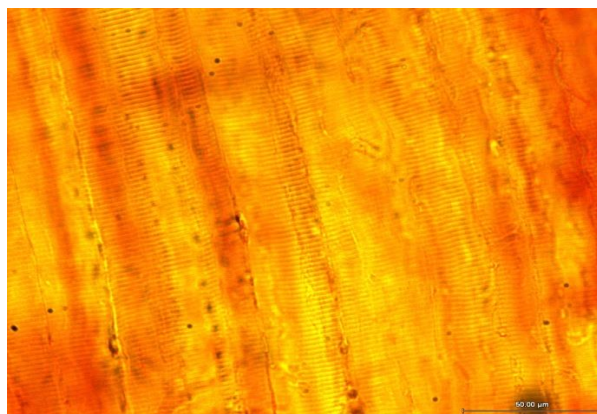
## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

М'язові волокна тих щурів, яким здійснювали внутрішньом'язове введення фулеренів C<sub>60</sub>, загалом не відрізнялися від м'язів контрольної групи. В литковому м'язі чітко було видно поперечну посмугованість волокон, що свідчить про правильне розташування саркомерів у м'язі. Мембрана м'язових волокон гладенька. Прошарок сполучної тканини – ендомізій – мало помітний. У поперечному перерізі волокна не гіпертрофовані. Численні ядра розміщені під сарколемою м'язового волокна на периферії,

тому їх добре видно під мікроскопом зі збільшенням  $\times 400$  (Рис. 1).



А



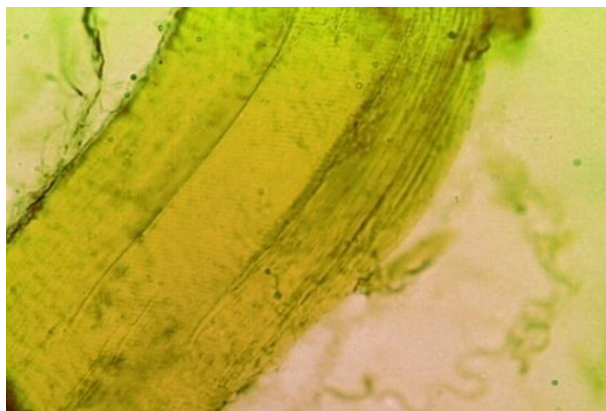
Б

**Рис. 1.** М'язові волокна *musculus gastrocnemius* щура. А – контроль, Б – контроль + C<sub>60</sub> фулерени. Світлова мікроскопія  $\times 400$ . Фарбування за ван Гізон

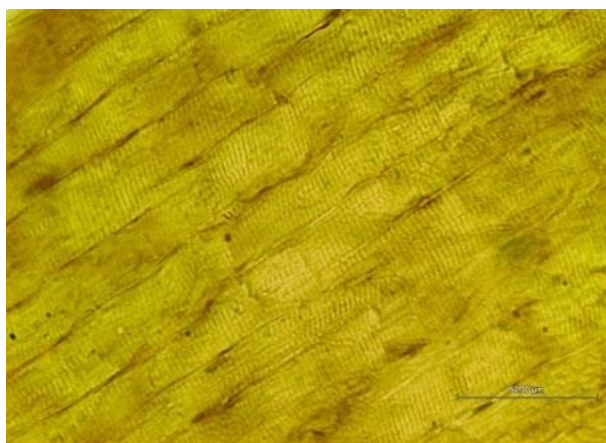
Морфометричні показники цих волокон не відрізняються від норми. Співвідношення розмірів інтерстиціального простору та товщини м'язового волокна відповідає таким самим показникам, що й у контрольних м'язових волокнах. Морфометричні показники *musculus gastrocnemius*: розмір м'язового волокна  $20,24 \pm 1,44 \mu\text{m}$ , товщина міжфібрилярного простору  $2,38 \pm 0,71 \mu\text{m}$ .

Після 1 години ішемії на тлі застосування C<sub>60</sub> фулеренів морфологічні показники досліджуваних волокон знаходилися на рівні показників фізіологічної норми або були з мінімальним обсягом пошкодження (рис. 2). Товщина м'язової тканини та міжфібрилярного простору в цій експериментальній групі становила  $19,83 \pm 1,15 \mu\text{m}$  і  $3,04 \pm 0,35 \mu\text{m}$  відповідно, що статистично практично не відрізнялися від показів у групі інтактних тварин.

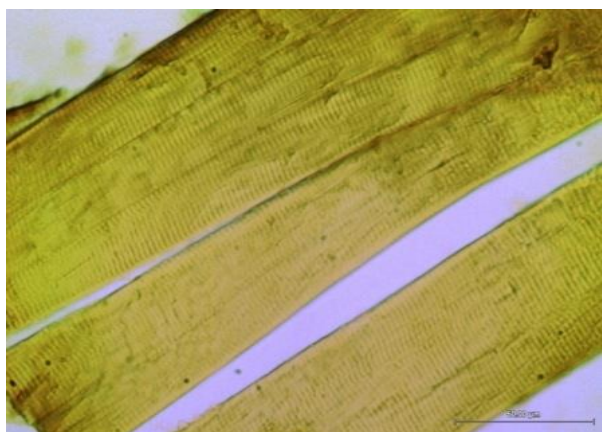
Порівняно з ішемізованим литковим м'язом (тривалість 1 година) м'язові волокна *m.gastrocnemius* за умови внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів та ішемії тривалістю



А



Б



В

**Рис. 2.** Морфологічні особливості м'язових волокон *m.gastrocnemius*:

А – за умови внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів; Б – ішемія 1 година; В – за умови внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів та ішемії тривалістю 1 година. Світлова мікроскопія,  $\times 400$ . Фарбування за Ван-Гізон

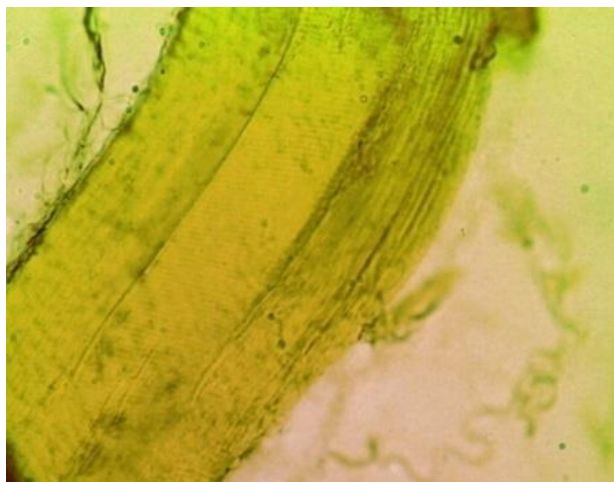
1 година мали чітку поперечну смугастість, яка є практично у всіх м'язових клітинах. Відзначено також деяке зниження гіперемії судинного русла і крововиливів (рис. 2).

Тоді як у ішемізованих волокнах виявлено нерівномірність товщини м'язових волокон, порушення поперечної посмугованості, виражену вакуолізацію, а також у деяких ділянках спостережено ознаки гіпертрофії волокон та виражені набряки сполучнотканинної строми. При цьому товщина м'язової тканини та міжфібрилярного простору за ішемії 1 година становила  $16.48 \pm 1.97 \mu\text{m}$  і  $3.32 \pm 0.46 \mu\text{m}$  відповідно.

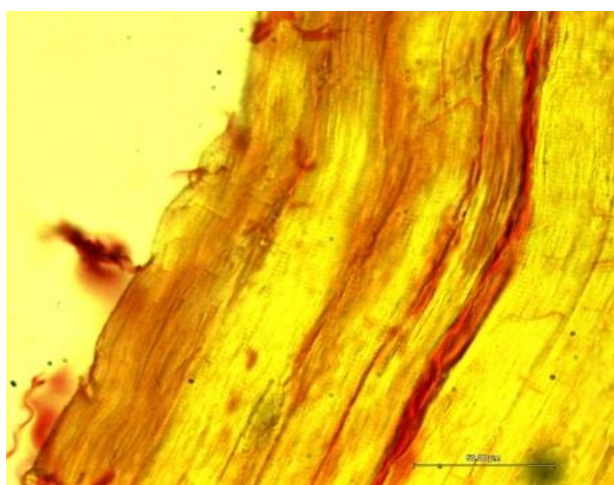
Патоморфологічна картина скелетної м'язової тканини щурів після 2-х годин ішемії на тлі застосування  $C_{60}$  фулеренів мала більш очевидні зміни, ніж при 1 годині. На цій стадії антиоксидантна активність фулеренів була дещо зниженою, що й спричинило помірно виражені мікроциркуляторні зміни м'язових волокон, втрату їхньої структурної цілісності, випинання мембрани, а також розволокнення внаслідок збільшення інтерстиціального простору (рис. 3). В цьому випадку ішемічний процес викликає незначні дегенеративні зміни, проте не настільки виражено, як при звичайній ішемізації тривалістю 2 години.

На цій стадії ішемічного ушкодження та внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів спостерігали м'язові волокна нерівномірної товщини, порівняно з контролем їхні розміри дещо варіювали. Товщина м'язового волокна в цьому випадку становила  $17.37 \pm 2.24 \mu\text{m}$ , при нормі –  $20.24 \pm 1.44 \mu\text{m}$ . Відносно величини міжфібрилярного простору, вбачаємо його збільшення –  $5.46 \pm 0.55 \mu\text{m}$ , при нормі  $2.38 \pm 0.71 \mu\text{m}$ .

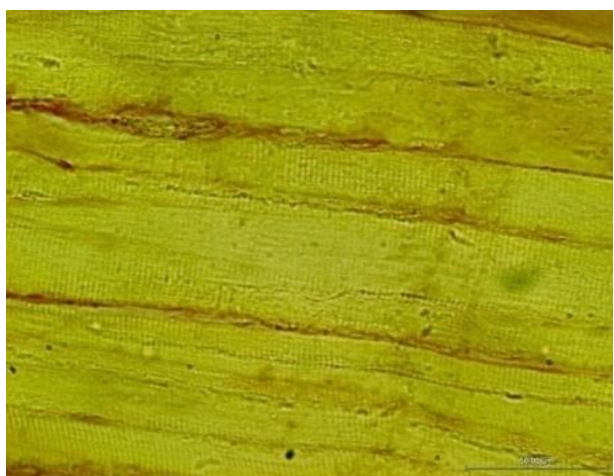
Зіставляючи раніше отримані дані при ішемії тривалістю 2 години з м'язовими волокнами *m.gastrocnemius* за умови внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів та ішемії тривалістю 2 години, вбачаємо, що антиоксидантна активність фулеренів спричинює позитивний вплив на морфологічну картину поперечно-посмугованих м'язів. Відсутні ознаки некротичного переродження м'язової тканини та значної кількості ядер у міжклітинному просторі (рис. 3). Натомість 2-годинна ішемія спричиняє зміни на рівні окремих клітин. Спостерігається утворення інвагінацій на сарколемі, вивільнення міомер у міжфібрилярний простір, фрагментацією міофібрил, та утворення колагенових структур на місці скоротливого апарату в тій частині міофібрили, що відділилася. Ядра у цих



А



Б



В

**Рис. 3.** Морфологічні особливості м'язових волокон *m.gastrocnemius*. Світлова мікроскопія,  $\times 400$ : А – за умов внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів; Б – ішемія 2 години; В – за умов попереднього введення  $C_{60}$  фулеренів та ішемії тривалістю 2 години. Фарбування за Ван-Гізона

ділянках мають збільшені розміри та стають блідими. Ще одним наслідком ішемії такої тривалості є набряк міжклітинної стромы, який призводить до того, що інтерстиціальний простір заповнює значна частина фіброblastів.

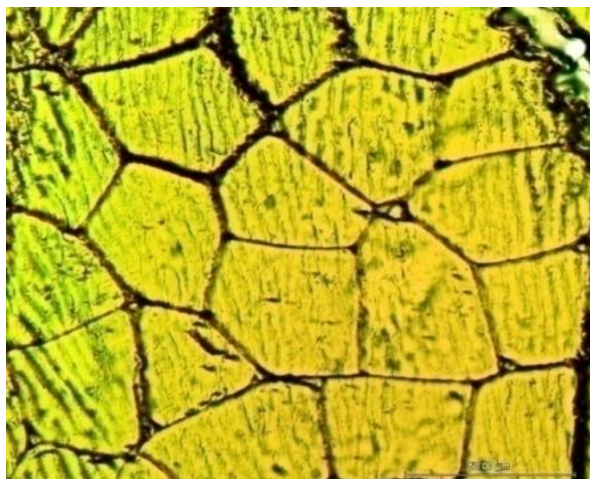
Якщо розглядати морфологічні особливості м'язових волокон литкового м'язу вже після 3-х годин ішемії на тлі застосування  $C_{60}$  фулеренів, то спостерігаємо явище, коли терапевтична дія  $C_{60}$  як антиоксиданту вже не має позитивного ефекту. Зменшується кількість життєздатних м'язових волокон, відзначаються некротично-деструктивні зміни м'язової тканини, відсутність ядер, гіперемія капілярного русла (рис. 4), відокремлення деяких м'язових волокон (рис. 4). Запальна інфільтрація значна і проявляється наявністю у периваскулярних зонах незначної кількості лімфоцитів.

При 3-годинному ішемічному ушкодженні м'язового волокна та внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів товщина м'язового волокна становила  $15.16 \pm 2.29 \mu\text{m}$ , при нормі –  $20.24 \pm 1.44 \mu\text{m}$ . Відповідно товщина ендомізію при ішемії 3 години становила  $5.76 \pm 0.51 \mu\text{m}$ , а в контрольній групі досліджуваних тварин –  $2.38 \pm 0.71 \mu\text{m}$ .

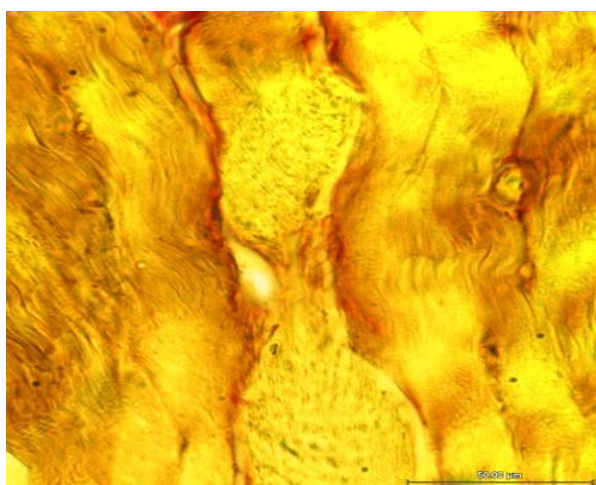
Порівняльна характеристика ішемізованого литкового м'язу (тривалість 3 год) з м'язовими волокнами *m.gastrocnemius* за умови внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів та ішемії тривалістю 3 години репрезентує незначну антиоксидантну активність фулеренів відносно ішемічної травми (рис. 4). За морфометричними показниками товщина досліджуваного поперечно-посмугованого волокна трохи вища, ніж при звичайній ішемізації, а розміри міжфібрилярного простору, навпаки, нижчі. Також за умов звичайної ішемії на цьому етапі з'являються ознаки некрозу в окремих м'язових волокнах, їх фрагментація та розриви. Відзначаємо збільшення ендомізію через утворення набрякової рідини і як наслідок набряку. Також варто відзначити велику кількість фібринових тромбів. А отже, виявляємо незначний захисний ефект  $C_{60}$  фулеренів на фоні звичайної ішемізації тривалістю 3 години.

Таким чином, можна зробити висновок, що застосування фулеренів як терапевтичного препарату при ішемічних ушкодженнях матиме виражені ефекти в основному на ранніх стадіях розвитку зазначених патологій. Зокрема, найбільший захисний ефект  $C_{60}$  фулеренів виявлено за ішемії тривалістю 1 година, дещо менший при 2-ох годинах і найменший результат при 3-ох годинах ішемії.

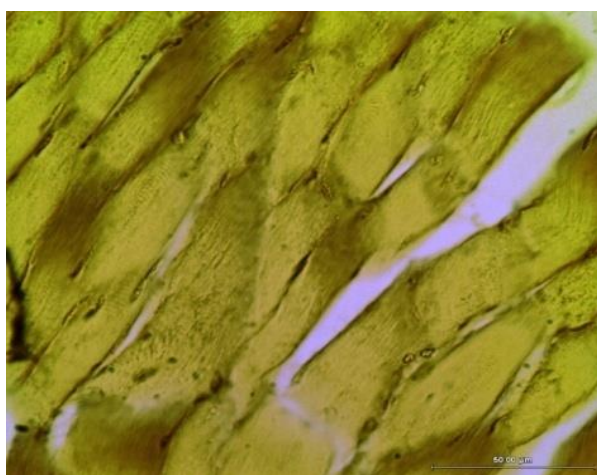
## ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ



А



Б



В

**Рис. 4.** Морфологічні особливості м'язових волокон *m.gastrocnemius*: А – за умов внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів; Б – ішемія 3 години; В – за умов внутрішньочеревного введення  $C_{60}$  фулеренів та ішемії тривалістю 3 години. Світлова мікроскопія,  $\times 400$ . Фарбування за Ван-Гізон

Немодифіковані (присінні) фулерени  $C_{60}$  – це ліпофільні молекули, вони нерозчинні у полярних розчинниках, зокрема у воді чи метанолі, краще розчиняються в аліфатичних і є максимально розчинними в ароматичних вуглеводнях, таких як толуол та бензол [4]. Завдяки гідрофобним властивостям молекула  $C_{60}$  може вбудовуватись у біологічні мембрани та локалізуватись у неполярних ділянках мембранних структур [5]. Фулереновий каркас є жорстким, і циклогексатрієнові одиниці у його структурі залишаються плоскими, незважаючи на істотне відхилення геометрії спряжених подвійних зв'язків від нормальної планарної. Напруга, що виникає внаслідок такого відхилення, є причиною високої реакційної здатності фулеренів  $C_{60}$ . Молекула  $C_{60}$  – досить сильний електронний акцептор, здатний приєднувати 1–6 електронів з утворенням відповідних аніонів  $C_{n60}$  (де  $n$  – кількість приєднаних електронів) [6]. Отже, подвійні зв'язки в каркасі  $C_{60}$  є електронodefіцитними, що й зумовлює електронакцепторні властивості молекули та її здатність легко приєднувати реагенти, що містять неспарений електрон (вільні радикали). Фулерен  $C_{60}$  інколи називають «губкою для радикалів». Наприклад, у роботі [43] показано, що одна молекула може приєднати 34 метильні радикали. Завдяки такій здатності фулерени діють у біологічних системах як уловлювачі вільних радикалів, зокрема гідроксильного та супероксидного. Оскільки гіперпродукція кисневмісних радикалів є причиною виникнення багатьох клінічних патологій, антирадикальна активність фулеренів  $C_{60}$  та їхніх похідних відкриває перспективи застосування цих сполук як антиоксидантів.

Ліпофільні властивості фулеренів  $C_{60}$  обмежують їх адсорбцію, проникність через стінку кишечника, розподіл в органах та проникнення всередину клітин, проте показано, що сполуки фулеренів здатні проникати через плазматичні мембрани та накопичуватися в окремих тканинах, що певною мірою залежить від способу введення  $C_{60}$  в організм та ступеня розчинності сполуки. При пероральному введенні фулерени  $C_{60}$  та їх малорозчинні похідні не засвоюються і виводяться з організму впродовж приблизно 160 год [32]. У разі внутрішньочеревного введення водної суспензії фулеренів  $C_{60}$  мишам та щурам у дозах 0,5 та 2 г/кг відповідно максимальний рівень акумуляції  $C_{60}$  (24%) спостерігався через 7 днів.

Методом сканувальної електронної мікроскопії виявлено накопичення кристалів C<sub>60</sub> у клітинах печінки та селезінки (у ретикулоендотеліальних клітинах), морфологічні ознаки тканини при цьому не змінювались [33].

Згідно з даними роботи [34], через добу після внутрішньочеревного введення суспензії фулерени C<sub>60</sub> виявляли в макрофагах печінки, через 7–12 днів – у гепатоцитах, купферовських та жирових клітинах без ознак їхнього ушкодження. У випадку внутрішньовенного введення малорозчинних похідних C<sub>60</sub> спостерігається швидкий розподіл їх усередині організму.

Так, з використанням міченої за <sup>14</sup>C C<sub>60</sub> піролідинокарбонової кислоти вже через 1–16 год після введення 62%, 11% та 1,2% від загальної кількості мітки виявляли у печінці, селезінці та мозку відповідно. Через 7 діб виявляли лише 2% мітки, зосередженої у скелетних м'язах [32].

Високорозчинні у воді похідні фулеренів C<sub>60</sub> виводяться значно швидше. Наприклад, дослідження розподілу радіоактивного фулерену 125I C<sub>60</sub>(OH) показало, що після внутрішньовенного введення сполука швидко, протягом 1 год, розповсюджується по всіх органах, окрім мозку, та акумулюється в печінці, нирках, селезінці і шлунку, тимчасом, як із тканин серця, легень, м'язів, шкіри та кишечника виводиться впродовж 72 год [35].

Згідно з токсикологічною класифікацією, сполуки, які виявляють токсичність у дозах, що перевищують 1 г/кг, належать до нетоксичних [37]. Про відсутність токсичності пристінних C<sub>60</sub> свідчать результати роботи [38], у якій встановлено, що внутрішньоочеревинне введення мишам суспензії C<sub>60</sub> (2,5 г/кг) не спричиняло загибелі тварин або порушень у поведінці впродовж 8 тижнів. Не виявлено токсичних ефектів колоїдних розчинів C<sub>60</sub> в експериментах *in vivo* та *in vitro* за сумарних доз до 25 мг/кг [39]. Водорозчинні похідні C<sub>60</sub>, як правило, також не виявляють гострої токсичності *in vivo* у дозах до 200–500 мг/кг [40].

Отже, фулерени C<sub>60</sub> виявляють унікальні фізико-хімічні властивості, які відкривають можливість їх медичного застосування. Хоча C<sub>60</sub> та його похідні, як правило, не виявляють гострої та хронічної токсичності, накопичення їх в організмі є негативним чинником. Використання фулеренів C<sub>60</sub> як антиоксидантів або фотосенситизаторів є перспективним, проте здатність молекули C<sub>60</sub> уловлювати радикали, так само як і здатність генерувати АФК після

фотозбудження, обмежується нерозчинністю C<sub>60</sub> у воді та агрегацією молекул. Уведення замісників у фулереновий кор частково вирішує цю проблему, однак для збереження біологічних ефектів виникає передусім потреба у дотримуванні балансу гідрофільних та гідрофобних властивостей молекули.

Характерним проявом ішемічного пошкодження є некроз і дисфункція мітохондрій. Хоча механізми, що лежать в основі ішемічного пошкодження, складні і не зовсім вивчені, деякі дослідження вказують на те, що мітохондрії відіграють основну роль у виживаності клітин; і не тільки тому, що вони відіграють основну роль у виробництві енергії для клітин, але й через їхню участь у генерації активних форм кисню (зокрема й супероксидів). (Honda та ін., 2005; Murphy та Steenberg, 2008).

Виділяють два основні типи загибелі клітин унаслідок ішемічного ушкодження – апоптоз та некроз. Ті клітини, що гинуть внаслідок апоптозу, мають такі морфологічні властивості, як конденсація ядра й цитоплазми та збереження цілісності зовнішньої мембрани. Однією з основних характеристик некрозу клітин є пошкодження плазматичної мембрани. Клітини втрачають здатність зберігати свій гомеостаз, виникають порушення іонного обміну, що призводить до гіпертрофії клітини (Lipton P., 1999).

Активізація процесів вільнорадикального окислення і пригнічення систем антиоксидантного захисту – характерний прояв ішемічного пошкодження.

Одним із механізмів, за допомогою яких вільні радикали викликають пошкодження тканин, є взаємодія гідроксильного радикала з атомами водню метильних груп поліненасичених жирних кислот. Цей процес ініціює перекисне окислення мембранних ліпідів, яке так само призводить до підвищення проникності клітинних мембран.

Утворення реактивних форм кисню збільшується із збільшенням періоду ішемії. Це також впливає на м'язові волокна й особливо на мембранні системи сарколеми та мітохондрій. Ушкодження клітин при ішемії-реперфузії пов'язане з підвищеною активністю фосфоліпази і протеази, що призводить до вивільнення вільних жирних кислот і продуктів їхнього розпаду та деградації білків цитоскелету [12].

Тривала ішемія скелетних м'язів є причиною редукції кальцієвих каналів SR, результатом чого є порушення кальцієвого гомеостазу: зниження рівня акумуляції Ca<sup>2+</sup> або

ж його відтоком внаслідок підвищення проникності мембрани СР. Ішемія скелетних м'язів, зумовлена тривалим стисненням чи судинним ушкодженням, в анаеробних умовах і при зниженні продукції АТФ пригнічує діяльність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, що призводить до накопичення внутрішньоклітинної рідини і зростання концентрації внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ . Крім того, концентрація нейтрофільних хемоатрактантів у постішемичній тканині сприяє високій локальній концентрації активованих нейтрофілів, як тільки починається реперфузія. Ці нейтрофіли пошкоджують реперфузовану м'язову тканину, звільняючи протеолітичні ферменти, генеруючи вільні радикали [Мальченко]. Відзначено участь кисневих радикалів у запуску швидкого звільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із СР внаслідок безповоротної втрати функцій кальцієвих каналів, зумовленої вільнорадикальним ушкодженням, що збільшує вірогідність їх відкриття [14, 17, 19].

Під час тривалої ішемії найбільш пошкодженим стає мітохондріальний апарат, що й підтверджують певні зміни: органели набувають кулястої форми, електронна щільність матрикса різко зменшується [20, 21], кристи у більшості органел відсутні або ж зазнають фрагментації. У складі найбільш ушкоджених волокон поряд із явищами кристалізації спостережено фрагментацію зовнішньої мітохондріальної мембрани. Також для мітохондріальної реакції характерним є патологічне розташування крист, поява кристалоїдів, осмофільних та мієлоїдних включень. Показник коефіцієнта сферичності мітохондрій різко зростає, відображаючи зміни форми більшості органел до майже ідеальної кулястої, що вкрай не характерне для мітохондрій скелетної м'язової тканини. Розвиток міопатії в ішемізованих мишей, пов'язаний із швидким збільшенням числа пошкоджених мітохондрій, окисним стресом, є прямим доказом того, що артеріальна оклюзія зумовлює хвороби м'язів і мітохондріальну патологію. Біоенергетичний дефіцит і компенсаторне збільшення обсягу дефектних мітохондрій займають центральне місце в процесах патофізіології ішемії скелетного м'яза [22]. В нормі більшість реактивних форм кисню продукується в мітохондріях, насамперед в електронтранспортному ланцюзі – комплексах I та III. Ушкодження мітохондрій, особливо в цих комплексах, експоненційно збільшує виробництво реактивних форм кисню [23].

Літературні дані демонструють велику кількість доказів, що вільні радикали, а саме

супероксид і гідрооксид, є основними патогенними факторами в процесі ішемичного пошкодження тканин. Вони включають ініціювання перекисного окиснення ліпідів, пряме інгібування мітохондріальних ферментів дихального ланцюга, інгібування АТФ-азної активності, інактивацію мембранних натрієвих каналів [11].

Дія відомих антиоксидантів заснована на тому, що одна молекула антиоксиданта нейтралізує один вільний радикал. При цьому визначити оптимальну дозу антиоксиданта досить складно для конкретного патологічного процесу. Відомо, що одна молекула фулерена  $\text{C}_{60}$  здатна приєднувати 34 метильні радикали [16].

Одні з найпотужніших антиоксидантів, які можна використати для корекції розвитку втоми скелетних м'язів, – біосумісні водорозчинні  $\text{C}_{60}$ -фулерени [44, 24]. Їм притаманна висока відновлювальна здатність – можливість приєднувати до шести електронів [26], внаслідок чого фулерени здатні ефективно захоплювати та інактивувати як супероксид аніон-радикал, так і гідроксильні радикали *in vivo* і *in vitro*. Також передбачаємо, що фулерени можна розглядати як потужний поглинач вільних радикалів, зокрема АФК, утворення яких відбувається при ішемичній травмі [17].

Доведено, що  $\text{C}_{60}$ -фулерени нормалізують клітинний обмін речовин та нервові процеси, підвищуючи стійкість до стресу, посилюють активність ензимів і регенеративну здатність тканин, виявляють виражені протівірусну, протизапальну та антиалергенну дії [26, 7], ефективно регулюють АТФазну активність актоміозину [9]. Експериментально встановлено, що  $\text{C}_{60}$ -фулерени та їхні похідні можуть бути допоміжними засобами в комплексній терапії завдяки здатності інтенсифікувати захисні функції імунної та антиоксидантної систем організму людини [10, 27–30]. Жодних токсичних ефектів чи летальних наслідків не було зафіксовано за час досліджень дії  $\text{C}_{60}$ -фулеренів після їх перорального введення в організм шурів загального дозування 2 г/кг упродовж 14 днів [31]. Вищенаведені дані свідчать про реальну перспективу застосування водорозчинних  $\text{C}_{60}$ -фулеренів, антиоксидантна дія яких значно перевищує таку дію відомих природних антиоксидантів – вітамінів С, Е і каротиноїдів [36, 41, 42] як потенційних агентів для підвищення ефективності функціонування скелетних м'язів людини модифікацією АФК.



На сьогодні накопичений великий експериментальний матеріал, який свідчить, що водорозчинний фулерен C<sub>60</sub>FAS і його похідні мають виражений антиоксидантний ефект, демонструє, що їх можна розглядати як перспективні лікарські засоби для профілактики і корекції ішемічних ушкоджень. Здатність фулеренів, які ніби нагадують «губку, котра всмоктує вільні радикали», і їхніх похідних інактивувати вільні радикали кисню зумовлено електронно-акцепторними властивостями їх псевдоароматичної структури. Науковці вважають, що антиоксидантна ефективність фулеренів залежить від числа активних центрів і відстані між активними центрами й атомами-мішенями. Фулерени здатні ефективно захоплювати та інактивувати як супероксид аніон-радикал, так і гідроксильні радикали *in vivo* та *in vitro* [17]. В експериментах *in vitro* було продемонстровано, що похідні C<sub>60</sub> фулерена, захоплені макрофагами, викликають викид протизапальних цитокінів. Автори стверджують, що для C<sub>60</sub> фулеренів та їхніх похідних характерні антигістамінна й антиоксидантна дії [11]. Отже, значне збільшення внутрішньом'язових колагенових структур, велика кількість нефункціонуючих м'язових волокон, запальні процеси і залучення у вогнище ушкодження активованих нейтрофілів, що вивільняють додаткові вільні радикали, знижують рівень функціонування скелетних м'язів. Останні провокують вазоконстрикцію, яка є характерним проявом ішемічних ушкоджень.

Патогенез розвитку ішемії зумовлений зниженням припливу артеріальної крові і значним збільшенням споживання тканинами кисню та субстратів обміну речовин. Причинами такого порушення можуть бути різні природні, патогенні чинники і несприятливі умови, вплив яких призводить до зменшення просвіту артеріальних судин та утруднення руху крові по них, що зі свого боку може призвести до прогресуючого розладу метаболічних, морфологічних і фізіологічних процесів у скелетних м'язах.

Основною перевагою використання C<sub>60</sub> фулеренів як потужних антиоксидантів є їхня здатність локалізуватися всередині клітини у мітохондріях та інших органелах, саме в яких за патологічних станів відбувається утворення вільних радикалів [42]. Це зумовлено тим, що ушкоджені ішемією мітохондрії здатні продукувати більшу кількість електронів завдяки їхньому «витоку» з електронно-транспортного ланцюга. Саме ці електрони

беруть участь в утворенні радикала супероксид-аніона. За ішемічного ушкодження скелетного м'яза найбільшу деструктивну небезпеку становлять активні форми кисню (АФК), тому використання C<sub>60</sub>-фулеренів має значно покращити толерантність м'яза до ішемії і прискорити його післятравматичне відновлення. На користь перспективності цього медико-біологічного застосування C<sub>60</sub>-фулеренів вказують деякі дослідження, де ці наночастинки проявили себе як ефективні поглиначі вільних радикалів, джерелами яких були ішемічні ушкодження травматичного походження тонкої кишки, а також легень ішемічно-реперфузійного генезу [17, 18].

Korthals та співавт. [15] відзначили, що застосування C<sub>60</sub>-фулеренів як терапевтичного препарату під час ішемічних ушкоджень матиме виражені ефекти в основному на початкових етапах розвитку патологій при унілатеральній васкулярній ішемії. Підтвердження цієї гіпотези ми спостерігали й у своїх дослідженнях.

Отже, в ході проведених досліджень усіх експериментальних груп виявлено, що зі збільшенням тривалості ішемічного ушкодження змінюється ступінь вираження морфологічних змін порівняно з контрольною групою тварин. Найбільшого ступеня дегенеративних змін зазнають волокна при ішемії тривалістю 3 години. Спостережено початкові етапи некрозу волокон, що супроводжуються зміною середніх розмірів товщини волокон із тенденцією до їх зменшення, та збільшенням кількості сполучної тканини між окремими волокнами. Отримані результати узгоджені з дослідженнями Кауко А. та співав. [13]. У своїй статті автори відзначали, що більш інтенсивні ультраструктурні зміни в м'язах виявлені вже після двох годин ішемії, вони підсилюються після 3-ох годин ішемії. Ступінь некрозу в м'язах після 3 год ішемії становив 20%.

Під час використання наноструктур C<sub>60</sub> фулеренів в якості протектора вільних радикалів було досліджено виражені антиоксидантні властивості цих речовин у кількох експериментальних групах. Вищезгадані результати знаходять своє підтвердження у статті Korthals та співавт. [15], де зазначено, що застосування C<sub>60</sub> фулеренів як терапевтичного препарату при ішемічних ушкодженнях та за умов хронічної алкоголізації у тварин виявлятимуть виражені захисні ефекти на початку впливу ушкоджень.

## ВИСНОВКИ

Застосування C<sub>60</sub> фулеренів як антиоксидантів при ішемічних ушкодженнях демонструють виражені захисні ефекти в основному на ранніх стадіях розвитку патології. Зі збільшенням тривалості ішемії протекторна дія C<sub>60</sub> фулеренів знижується. Зокрема, відзначаємо поступові дегенеративні зміни у м'язових волокнах, втрату їхньої структурної цілісності у вигляді випинань мембрани, а також розволокнення внаслідок збільшення інтерстиціального простору.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Богданов, О. А.; Бульчева, И. В.; Чекарева, Г. А. Морфологическая характеристика изменений скелетных мышц при острой ишемии конечностей и постшемической рециркуляции. *Патологическая анатомия циркуляторных расстройств и нарушений тканевого гомеостаза*: сб. науч. тр., М., 1987; с 49–53.

2. Білобров, В.; Вулицька, Д.; Ноздренко, О. Зміна динамічної відповіді активного м'язу muscle soleus за умов його ішемізації у алкоголізованих щурів при введенні C<sub>60</sub> фулерену. *Scientific Journal «Science Rise: Biological Science»*; 2017, 5 (8), с 27.

3. Заводський, Д.; Ноздренко, Д.; Хома, О.; Сороката, В. Зміна швидкісно-силових показників скорочення гомілкового м'язу щура за умов штучно викликаної васкулярної ішемії. *Вісник Київського університету ім. Тараса Шевченка. Серія біологічна*; 2013, 63, с 5–7.

4. Мотузюк, О. П.; Ноздренко, Д. М.; Степанюк, Я. В.; Заводський, Д. О. Ультроструктурні зміни міофібрил у людини при ішемічній контрактурі. *Науковий вісник Волинського національного університету ім. Лесі Українки: Біологічні науки*; 2012, 2, с 89–92.

5. Хома, О.; Сорока, В.; Ноздренко, Д. Морфологічні зміни саркомера штучно ішемізованого м'язу щура. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київський нац. ун-т ім. Тараса Шевченка*; 2012, с 28–30.

6. Елецкий, А. В.; Смирнов, Б. М. Фуллерены и структуры углерода. *Усп. физ. наук*; 1995, 9, с 977–109.

7. Labille, J.; Brant, J.; Villieras, F.; et al. Affinity of C<sub>60</sub> fullerene with water. *Fuller. Nanotub. Carb. Nanostruct*; 2006, 14, pp 307–314.

8. Cuzzocrea, S.; Riley, D. P.; Caputi, A. P.; Salvemini, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*; 2001, 53, pp 135–159.

9. Dahleback, L. O.; Rais, O. Morphologie changes in striated muscle following ischemia. Immediate pastischemic phase. *Acta chir. Scand*; 1966, 131, p 430.

10. Deguchi, S.; Alarg, R.; Tsujii, K. Stable dispersions of fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> in water. Preparation and characteristics. *Langmuir*; 2001, 17, pp 6013–6017.

11. Ryan, J.; Bateman, H.; Stover, A.; Gomez, G.; et al. Fullerene Nanomaterials Inhibit the Allergic Response. *The Journal of Immunology*; 2007, 179, pp 665–672.

12. BrasileiroI, J. L.; Fagundes, D. J.; Mijji, L. O.; et al. Ischemia and reperfusion of the soleus muscle of rats with pentoxifylline. *Eur. J of Phisio*; 1979, 379, pp 209–214.

13. Kauko, A.; Hjelt, L. Morphological changes in striated muscle during ischemia. A clinical and histological study in man. *Actaorthop. Scandinav*; 1998, 39, pp 13–19.

14. Kolosnjaj, H.; Szwarc, H.; Moussa, F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv. Exp. Med. Biol*; 2007, 620, pp 168–180.

15. Korthals, J.; Maki, T.; Gieron, M. Nerve and muscle vulnerability to ischemia. *J Neurol Science*; 1985, 71, pp 283–290.

16. Krustic, P. J.; Wasserman, E.; Keizer, P. N.; Morton, J. R.; Preston, K. F. Radical reactions of C<sub>60</sub>. *Science*; 1991, 254, pp 1183–1185.

17. Lai, H.; Chen W.; Chiang L. Free radical scavenging activity of fullerene on the ischemia-reperfusion intestine in. *World J Surg*; 2000, 24 (4), pp 450–458.

18. Lai, Y.; Murugan, P.; Hwang, K. Fullerene derivative attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Life Science*; 2003, 72 (11), pp 1271–1278.

19. Badhwar, A.; Dungey, A. A.; Harris, K. A.; et al. Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue protection. *J Surg Res*; 2003, 109, pp 62–67.

20. Littlefield, R. S.; Fowler, V. M. Thin filament length regulation in striated muscle sarcomeres: pointedend dynamics go beyond a nebulin ruler. *Semin Cell Dev Biol*; 2008, 19, pp 511–519.

21. Mastren, F. A. Compartmental syndrome: a unified concept. *Clin. Orthop*; 1975, 113.

22. Skjeldal, S.; Groggaard, B.; Reikerås, O.; et al. Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb: evaluation of reperfusion and necrosis. *Eur Surg Res*; 1994, 26, pp 94–100.

23. Morris, T. E.; Sulakhe, P. V. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free Rad Biol Med*; 1997, 22, pp 37–47.

24. Nguyen, A.; Mellion, M.; Gilchrist, J.; et al. Experimental Alcohol-Related Peripheral Neuropathy: Role of Insulin/IGF Resistance. *Nutrients*; 2012, 4 (8), pp 1042–1057.

25. Nozdrenko, D. M.; Bogutska, K. I.; Prylutsky, Y. I.; Ritter U. C<sub>60</sub> fullerene effect on the dynamics of fatigue processes in rat soleus muscle after ischemia-reperfusion. *Biotechnologia Acta*; 2014, 7, pp 43–51.

26. Pipinos, I.; Judge, A.; Selsby, J.; et al. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber

- type. *Vascular and Endovascular Surgery*; 2008, 42, pp 101–102.
27. Prylutska, S. V.; Grynyuk, I. I.; Matyshevska, O. P.; et al. Antioxidant properties of C60 fullerenes in vitro. *Fullerenes. Nanotubes. Carbon Nanostructures*; 2008, 16, pp 698–705.
28. Prylutska, S. V.; Matyshevska, O. P.; Grynyuk, I. I.; et al. Biological effects of C60 fullerenes in vitro and in a model system. *Mol. Cryst. Liq. Cryst*; 2007, 468, pp 265–274.
29. Reilly, M.; McKoy, G.; Mantle, D.; et al. Protein and mRNA levels of the myosin heavy chain isoforms I, IIa, IIx and IIb in type I and type II fibre predominant rat skeletal muscles in response to chronic alcohol feeding. *J. Muscle Res. Cell Motil*; 2000, 21, pp 763–773.
30. Sabido, F. Skeletal muscle ischemia-reperfusion injury: a review of endothelial cell-leukocyte. *J. Invest Surg*; 1994, 7, pp 39–47.
31. Shakil, H.; Gurule, M.; Larson, R. Amelioration of ischemia-reperfusion injury with cyclic peptide blockade of ICAM-1. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology Published*; 2003, 284, pp 1260–1268.
32. Simonides, W. S.; Hardeveld, C. An assay for sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in muscle homogenates. *Anal Biochem*; 1990, 191, pp 321–331.
33. Appell, H. J.; Gloser, S.; Duarte, J. A.; et al. Skeletal muscle damage during tourniquet-induced ischaemia. The initial step towards atrophy after orthopaedic surgery. *Eur J Appl Physiol*; 1993, 67, pp 342–347.
34. Sabido F.; Milazzo V. J.; Hobson R. W.; Duran W. N. Skeletal Muscle Ischemia-Reperfusion Injury: A Review of Endothelial Cell-Leukocyte Interactions. *Journal of Investigative Surgery*; 1994, 7, pp 39–47.
35. Vignaud, A. C.; Hourde, C. F.; Medja, F. O.; et al. Skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury in mice. *Biomedicine and Biotechnology*; 2010, 10, pp 347–356.
36. Smith, A.; Hayes, G.; Romaschin, A.; Walker, P. The role of extracellular calcium in ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Surg. Res*; 1990, 49, pp 153–156.
37. Colburn, M. D.; Quiñones-Baldrich, W. J.; Gelabert, H. A.; et al. Standardization of skeletal muscle ischemic injury. *J Surg Res*; 1992, 52 (4), p 309.
38. Appell, H. J.; Duarte, J. A.; Remiao, F.; et al. Structural alterations of skeletal muscle induced by ischemia and reperfusion. *Basic Appl. Myol*; 1999, 9, pp 263–268.
39. Scharff, P.; Risch, K.; Abelmann, L.; et al. Structure of C60 fullerene in water: spectroscopic data. *Carbon*; 2004, pp 1203–1206.
40. Greising, S. M.; Gransee, H. M.; Mantilla, C. B.; Sieck, G. C. Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle WIREs. *Syst Biol Med*; 2012, 10, pp 1002–1184.
41. Tountas, C. P.; Bergman, R. A. Tourniquet ischemia: ultrastructural and histochemical observations of ischemic human muscle and of monkey muscle and nerve. *Journal of Hand Surgery*; 1977, 31, pp 31–37.
42. Tsai, M. C.; Chen, Y. H.; Chiang, L. Y. Polyhydroxylated C60 fullerene, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in vitro. *J Pharm Pharmacol*; 1997, 49 (4), pp 438–445.
43. Wang, I. C.; Tai, L. A.; Lee, D. D. C<sub>60</sub> and Water-Soluble Derivatives as Antioxidants Against Radical-Initiated Lipid Peroxidation. *J. Med. Chem*; 1999, 42, pp 4614–4620.
44. Xie, Q.; Perez-Cordero, E.; Echegoyen, L. Electrochemical Detection of C60 and C70 Enhanced Stability of Fullerenes in Solution. *Am. Chem. Soc*; 1992, 114, pp 3978–3980.