

ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця

на правах рукопису

ВАН НАНЬ

УДК [616.74-001-06+616.74-009.12]-092.9:[546.26:620.3]

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВПЛИВ C_{60} ФУЛЕРЕНІВ НА ДИНАМІКУ СКОРОЧЕННЯ
MUSCULUS SOLEUS ЩУРІВ ПІСЛЯ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛІЗАЦІЇ**

09 Біологія

091 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

_____ Ван Нань

Науковий керівник: Мотузюк Олександр Петрович, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології людини і тварин Волинського національного університету імені Лесі Українки

ЛУЦЬК - 2024

АНОТАЦІЯ

Ван Нань. Вплив C_{60} фулеренів на динаміку скорочення *musculus soleus* щурів після хронічної алкоголізації. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. Волинський національний університет імені Лесі Українки, проспект Волі, 13, Луцьк, Волинська область.

В роботі дослідженню вплив водорозчинних C_{60} фулеренів на динамічні параметри скорочення скелетних м'язів щурів після 3, 6 та 9-ти місячної хронічної алкоголізації. Досліджено зміни даних параметрів в процесі відновлення, через 1 та 2 місяці після припинення вживання алкоголю. При аналізі механокінетики скорочення, оцінювали основні біомеханічні маркери скоротливого процесу: час розвитку втоми в досліджуваних м'язах, рівень мінімальної та максимальної сили скорочення, рівень імпульсу м'язової сили (як аналога м'язової потужності). Визначено оптимальну дозу використання водорозчинного C_{60} фулерену, при дії якої зафіксовані найбільш вагомні позитивні ефекти впливу на розвиток патологічних змін в м'язовій динаміці при розвитку алкогольної міопатії. Зафіксовано збільшення силової продуктивності м'яза порівняно з щурами групи «алкоголь» на 40-45%. Показано, що при розвитку хронічної алкогольної міопатії, застосування водорозчинного C_{60} фулерену в оптимальній дозі 1 мг/кг покращує процеси відновлення механокінетики скорочення після припинення алкоголізації. Всі описані зміни підтверджується аналізом біохімічних маркерів плазми крові, які відповідальні за якість скорочувального процесу. В роботі виявлена оптимальна схема застосування водорозчинного C_{60} фулерену для одержання найбільш вагомних позитивних результатів. Доведено, що вживання C_{60} фулерену разом з алкоголем приводить до зменшення негативних ефектів хронічної алкогольної

інтоксикації на 12-15% більше в порівнянні з схемою введення фулерену через годину після вживання алкоголю або за годину до його введення. Доведено, що схема спільного введення алкоголю та C₆₀фулерену приводить до віддалення часу виникнення процесів втоми при розвитку хронічної алкогольної міопатії, та покращує якість відновлення механокінетики скорочення скелетного м'яза і є ефективною саме при тривалому розвитку алкогольної міопатії. Одержані результати є підґрунтям для подальшої розробки інноваційних фармакологічних препаратів на основі C₆₀ фулеренів для покращення реабілітаційних процедур при міопатичних розладах, викликаних алкогольною інтоксикацією.

Ключові слова: C₆₀ фулерен, скелетні м'язи, алкогольна міопатія, втома скелетних м'язів, скорочення, механокінетичні параметри, максимальна та мінімальна сила скорочення, електрична стимуляція, оксидативний стрес, АФК, антиоксидантна система, щурі.

ABSTRACT

Wang Nan. The effect of C₆₀ fullerenes on the dynamics of musculus soleus contraction in rats after chronic alcoholisation.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the speciality 091 Biology. Lesya Ukrainka Volyn National University, 13 Voli Avenue, Lutsk, Volyn region.

In this work, the influence of water-soluble C₆₀ fullerenes on the dynamic parameters of skeletal muscle contraction in rats after 3, 6 and 9 months of chronic alcoholisation was investigated. Changes in these parameters during the recovery process, 1 and 2 months after cessation of alcohol consumption were studied. In the analysis of the contraction mechanokinetics, the main biomechanical markers of the contractile process, were evaluated: the time of fatigue development in the studied muscles, the level of minimum and maximum contraction force, the level of muscle force impulse (as an analogue of muscle power). The optimal dose of water-soluble

C60 fullerene was determined, which showed the most significant positive effects on the development of pathological changes in muscle dynamics in the development of alcoholic myopathy. An increase in muscle strength performance by 40-45% was recorded in comparison with rats of the "alcohol" group. It has been shown that in the development of chronic alcoholic myopathy, the use of water-soluble C60 fullerene at an optimal dose of 1 mg/kg improves the processes of restoring the mechanokinetics of contraction after cessation of alcohol consumption.

All the described changes are confirmed by the analysis of biomechanical plasma markers responsible for the quality of the contractile process. The study revealed the optimal scheme for the use of water-soluble C60 fullerene to obtain the most significant positive results. It is proved that the use of C60 fullerene together with alcohol leads to a 12-15% reduction in the negative effects of chronic alcohol intoxication compared to the scheme of administering fullerene one hour after drinking alcohol or one hour before it is administered. It was proved that the scheme of co-administration of alcohol and C60 fullerene leads to an increase in the time of onset of fatigue processes in the development of chronic alcoholic myopathy, and improves the quality of recovery of skeletal muscle contraction mechanokinetics and is effective in the case of prolonged development of alcoholic myopathy. The results obtained are the basis for further development of innovative pharmacological agents based on C60 fullerenes to improve rehabilitation procedures for myopathic disorders caused by alcohol intoxication.

Key words: C60 fullerene, skeletal muscle, alcoholic myopathy, skeletal muscle fatigue, contraction, mechanokinetic parameters, maximum and minimum contraction force, electrical stimulation, oxidative stress, ROS, antioxidant system, rats.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus:

1. Ноздренко Д. М., **Ван Нань**, Мотузюк О. П., Виговська О. В., Богуцька К. І., Нурищенко Н.Є., Прилуцький Ю. І. Аналіза скорочення скелетних м'язів хронічноалкоголізованих щурів за дії водорозчинного С60-фуллерену. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*. 2021, т. 19, № 2, сс. 475–485. doi.org/10.15407/nnn.19.02.475 (Внесок авторів: Концептуалізація, керівництво, Мотузюк О., Ноздренко.; методологія: Ван Нань, Прилуцький Ю.І.; виконання дослідження: Ноздренко Д. М., Ван Нань, Мотузюк О. П., Виговська О. В.; статистичний аналіз: Ван Нань, Ноздренко Д.М., Нурищенко Н.Є.; написання оригінального тексту статті: Ван Нань, Богуцька К.І.; написання відповідей на рецензії та редагування – Нурищенко Н.Є., Прилуцький Ю.І.).
2. Ноздренко Д. М., **Ван Нань**, Мотузюк О. П., Виговська О. В., Богуцька К. І., Дрозд П.Ю., Прилуцький Ю. І. Використання стимуляційних маркерів для аналізу терапевтичного впливу С60-фуллерену на динаміку м'язового скорочення хронічно-алкоголізованих щурів . *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології - Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*. 2021, 19 (3). С. 767-777. doi.org/10.15407/nnn.19.03.767 (Внесок авторів: Концептуалізація, керівництво, Мотузюк О., Ноздренко.; методологія: Ван Нань, Прилуцький Ю.І.; виконання дослідження: Ноздренко Д. М., Ван Нань, Мотузюк О. П., Виговська О. В.; статистичний аналіз: Ван Нань, Ноздренко Д.М., Дрозд П.Ю.; написання оригінального тексту статті: Ван Нань, Богуцька К.І.; написання відповідей на рецензії та редагування – Мотузюк О.П., Прилуцький Ю.І.).
3. **Wang Nan**, Motuziuk O., Mishchenko I., Zhou Yingting. Levels of Relevant Inflammatory Factors and Oxidative Stress Markers in Alcoholic Myopathy : a Meta-analysis. *Chinese General Practice*. 2022, Vol. 25. (33). Pp. 4123-4129. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0214 (Внесок авторів: Концептуалізація, керівництво, Мотузюк О., Ван Нань.; методологія: Ван Нань, Жоу Їнгтін; виконання дослідження: Ван Нань, Мотузюк О. П., Міщенко І.В.; формальний аналіз: Ван Нань, Міщенко І.; написання оригінального тексту

статті: Ван Нань, Мотузюк О.П.; написання відповідей на рецензії та редагування – Ван Нань, Мотузюк О.П.).

4. Nozdrenko D., **Wang Nan**, Motuziuk O., Prylutska S., Vygovska O., Bogutska K., Dmytrotsa O., Lynchak O., Prylutskyu Yu. The effect of C60-fullerenes on the recovery of musculus soleus contraction dynamics in rats after chronic alcoholization. • *Біологічні Студії / Studia Biologica* . 2024 . T. 18 / No 1 С. 43–56 Doi: <https://doi.org/10.30970/sbi.1801.755> (Внесок авторів: Концептуалізація, керівництво: Мотузюк О., Ноздренко Д.М.; методологія: Ван Нань, Прилуцький Ю.І.; виконання дослідження: Ноздренко Д. М., Ван Нань, Мотузюк О. П., Виговська О. В.; статистичний аналіз: Ван Нань, Ноздренко Д.М., Дмитроца О.Р.; написання оригінального тексту статті: Ван Нань, Богуцька К.І.; написання відповідей на рецензії та редагування – Мотузюк О.П., Линчак О.).

Статті у фахових виданнях України

5. **Wang Nan**, Motuziu O., Mischenko I. A review of several myopathy related to mitochondrial dysfunction. *Нотатки сучасної біології*. 2021. 2. Рр. 75-81. <https://doi.org/10.29038/NCBio.21.2.45-54> . (Внесок авторів: Концептуалізація, керівництво: Мотузюк О.; методологія: Ван Нань,; виконання аналізу: Ван Нань, Мотузюк О. П., Міщенко І.В; формальний аналіз: Ван Нань, Мотузюк О.П.; написання оригінального тексту статті: Ван Нань, Міщенко І.; написання відповідей на рецензії та редагування – Мотузюк О.П., Ван Нань.).

6. **Wang Nan**, Motuziuk O. The Bibliometric Analysis of the Alcohol-induced Muscle Disease Based on CiteSpace. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки Серія: Біологічні науки*, 2020, 2 (389), С. 83-91. (Внесок авторів: Концептуалізація, керівництво: Мотузюк О.; методологія: Ван Нань,; виконання аналізу: Ван Нань, Мотузюк О. П.; формальний аналіз: Ван Нань, Мотузюк О.П.; написання оригінального тексту статті: Ван Нань.; написання відповідей на рецензії та редагування – Мотузюк О.П., Ван Нань.).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. **Ван Нань**, Мотузюк О., Ноздренко О. Вплив C60 фулеренів на динаміку скорочення muscle soleus хронічно алкоголізованих щурів. Proceedings of the 9th International Scientific and Practical Conference «Global and Regional Aspects of Sustainable Development» (October 6-8, 2023). Copenhagen, Denmark. С. 137-138.
8. **Wang Nan** , Motuziuk O., Nozdrenko O. Exploring the potential of water-soluble fullerene derivative C60-PDA-GSH for cellular protection against oxidative stress: design, synthesis, characterization, and performance analysis. The 6th International scientific and practical conference “Modern research in science and education” (February 8-10, 2024) BoScience Publisher, Chicago, USA. 2024. P 39-40.
9. **Wang Nan**, Motuziuk O., Nozdrenko O. The therapeutic potential of C60 fullerene water solution under conditions of alcoholic myopathy. The 6th International scientific and practical conference “Global science: prospects and innovations” (February 1-3, 2024) Cognum Publishing House, Liverpool, United Kingdom. 2024. p. 26-30.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	4
ЗМІСТ	6
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	10
ВСТУП	11
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	16
1.1 Фізіологія скорочення скелетного м'яза	16
1.2 Регуляція скорочення скелетного м'яза	19
1.3 Алкоголь-індуковані пошкодження скелетних м'язів.	23
1.4 Патологічні ознаки алкогольної міопатії	25
1.5 Зменшення швидкості синтезу м'язових білків і втрата м'язової маси.	26
1.6 Порухення про-антиоксидантного балансу при розвитку алкогольної міопатії.	28
1.7 М'язові втома і слабкість, як результат змін при алкогольній міопатії.	31
1.8 C ₆₀ фулерен: структура та біологічна активність	34
1.9 Активність антиоксидантних систем в процесі розвитку алкогольної міопатії	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	41
2.1 Лабораторні щурі – об'єкт для моделювання хронічної алкогольної міопатії	41
2.2 Модель індукції хронічної алкогольної інтоксикації.	43
2.3 Анатомо-гістологічна характеристика <i>musculus soleus</i>	44
2.4 Анестезія, операційне втручання та метод евтаназії	46
2.5 Устаткування для експериментів на м'язовому препараті	51
2.6 Вимірювані параметри скорочення <i>musculus soleus</i>	57
2.7 Методика використання світлової мікроскопії у дослідженнях	63

2.8 Приготування та характеризування водного колоїдного розчину C ₆₀ фулеренів	64
2.9 Біохімічний аналіз	67
2.10 Статистичний аналіз	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	69
3.1 Використання механокенетичних маркерів для аналізу впливу водного розчину C ₆₀ фулерену на динаміку м'язового скорочення хронічно-алкоголізованих щурів	69
3.2 Аналіз змін флуктуаційних коливань м'язової сили при терапії водорозчинним фуллереном C ₆₀ хронічно алкоголізованих щурів	75
3.3 Аналіз розвитку втомних процесів при розвитку алкогольної міопатії	82
3.4 Вплив C ₆₀ фулеренів на відновлення динаміки скорочення musculus soleus щурів після хронічної алкоголізації	87
3.5 Концентрація алкоголю у крові піддослідних щурів	94
3.6 Гістологічні дослідження	95
УЗАГАЛЬНЕННЯ	98
ВИСНОВКИ	102
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	103

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ	аденозиндифосфат
АМ	алкогольна міопатія
АТФ	аденозинтрифосфат
АЦП	аналого-цифровий перетворювач
АФК	активні форми кисню
АДГ	алкогольдегідрогеназа
КФК	креатинфосфокіназа
ЛДГ	лактатдегідрогеназа
ЛД	летальна доза
МДА	малоновий диальдегід
ПД	потенціал дії
ПОЛ	перекисне окиснення ліпідів
СР	саркоплазматичний ретикулюм
С ₆₀ ФВР	водний розчин С ₆₀ фулерену
ТБК- активні продукти	реакційно здатні сполуки до тіобарбітурової кислоти
ХАМ	хронічна алкогольна міопатія
GSH	відновлений глутатіон

ВСТУП

Актуальність теми. Довготривале вживання алкоголю приводить до погіршення функціонування скелетних м'язів, причому м'язова дисфункція розвивається незалежно від віку [1]. Найбільш поширеною міопатією скелетних м'язів є хронічна алкогольна міопатія: понад 12% людей страждають на цей стан протягом тривалого часу [2]. Безпосереднім наслідком алкогольної міопатії є погіршення скорочувальної здатності м'язів та зменшення їх сили [3]. Причиною цього є як безпосередня ультраструктурна дезінтеграція міоцитів, їх подальша атрофія [4], так і зміни електролітичного гомеостазу та біоелектричної активності [2]. У дослідженні [5] показано, що алкогольна міопатія є більш поширеною, ніж інші захворювання (наприклад, цироз, кардіоміопатія або нейропатія), спричинені алкоголізмом. Це може бути пов'язане з розкладанням м'язового білка, спричиненого дією вільних радикалів, які генеруються у великих кількостях у алкоголізованих тканинах. Експерименти на щурах [6,7] показали, що тривалий прийом алкоголю пригнічує синтез білка м'язових волокон II типу, спричиняє дисфункцію нервово-м'язового збудження, зменшує кількість м'язових волокон та силову відповідь. Виникнення м'язової слабкості у разі розвитку алкогольної міопатії певною мірою може бути компенсовано підвищеною активністю синергічних м'язових груп, що призводить до уявного відчуття відсутності значних міотичних ушкоджень [8]. Однак, прояв флуктуаційних коливань на фазах утримання максимальних силових зусиль м'яза призводить до неможливості корекції точнісного позиціонування суглобів [9,10]. В результаті цілий м'яз, як динамічна система, не спроможний адекватно реалізувати відповідь на частотну стимуляцію, що надходять із центральної нервової системи. Характер і рівень м'язових дисфункцій пов'язані з рівнем

розвитку патологічних процесів, аналіз яких у час може бути проведено винятково на феноменологічному рівні.

У процесі розвитку алкогольної міопатії насамперед відбувається утворення вільних радикалів у дисфункціональних мітохондріях [11,12], що веде до руйнування мембранних структур міоцитів та функціональних порушень їх ферментних систем (зниження активності Na^+/K^+ -АТФ-ази та підвищення – Ca^{2+} -АТФ-ази). Пригнічення активності Na^+/K^+ -АТФ-ази [13] пригнічує специфічне збільшення Na^+ провідності, яка виникає у відповідь на адекватний подразник і, таким чином, перешкоджає розвитку збудження у міоцитах. Це може привести до тимчасового розбалансування часу встановлення гладкого тетанусу, що, в свою чергу, збільшує рівень флуктуаційних коливань силової відповіді м'яза (так званий «тремор»).

Відомо, що C_{60} фулерени здатні ефективно захоплювати та інактивувати вільні радикалі у системах *in vitro* та *in vivo* [14,15]. Більше того, вони проникають у клітини і локалізуються в мітохондріях [16]. У ряді експериментах *in vivo* було показано, що введення біосумісних водорозчинних C_{60} фулеренів [17] приводить до значних позитивних терапевтичних ефектів після ініціацій ішемічного пошкодження [18], втоми [19,20], атрофії [21] та травми [22] скелетних м'язів. Однак, ефекти, що спостерігаються, істотно залежали від використовуваних доз і схем введення водного розчину C_{60} фулеренів (C_{60}FAS) на тлі ініціації тієї чи іншої патології. Таким чином, дослідження оцінки впливу C_{60}FAS на величину силової відповіді м'язів хронічно алкоголізованих щурів, зокрема, на рівень його флуктуаційних коливань залежно від дози та схеми застосування (профілактична та терапевтична) препарату є на сьогодні актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційну роботу виконано в межах планових наукових досліджень кафедри

фізіології людини і тварин ВНУ імені Лесі Українки та в межах проєкту науково-технічної (експериментальної) розробки МОН України «Розробка технології застосування водорозчинних C_{60} фулеренів для зменшення втоми скелетних м'язів» (№ державної реєстрації 0121U109986).

Метою роботи було дослідити вплив C_{60} фулеренів на динаміку скорочення *musculus soleus* щурів після хронічної алкоголізації.

Відповідно до мети були поставлені такі **завдання**:

1. Визначити рівні змін основних механокінетичних параметрів скорочення *musculus soleus* щурів (сила скорочення, імпульс м'язової сили, час досягнення максимальної силової відповіді, рівень мінімальної сили скорочення, розвиток втомлювальних процесів - часу досягнення силою 50% і 25% від початкового значення, рівень флуктуацій на фазах утримання максимальних силових рівнів) після хронічної алкоголізації протягом 3, 6 та 9 місяців при дії C_{60} ФВР у різних концентраціях;

2. визначити біохімічні показники плазми крові (маркери м'язової дисфункції та про-антиоксидантного балансу) після хронічної алкоголізації протягом 3, 6 та 9 місяців при дії C_{60} ФВР у різних дозах;

3. дослідити вплив C_{60} фулерену на біофізичні та біохімічні параметри скорочення скелетного м'яза та біохімічні параметри плазми крові щурів через 1 та 2 місяці після припинення алкогольної інтоксикації.

Об'єкт дослідження: *musculus soleus* та плазма крові щурів за розвитку хронічної алкогольної міопатії та дії C_{60} ФВР .

Предмет дослідження: біофізичні характеристики скорочення *musculus soleus* та біохімічні показники плазми крові щурів за розвитку хронічної алкогольної міопатії та дії C_{60} ФВР .

Методи дослідження: атомно-силова мікроскопія, хірургічні та стереотаксичні методи виділення нервово-м'язового препарату, тензометричні

методи, динамічне розсіювання світла, біохімічний аналіз плазми крові, статистичний аналіз даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Показано, що рівень розвитку хронічної алкогольної міопатії при застосуванні в якості терапевтичного агента препарату водного розчину C_{60} фулерену зменшується. Фулеренова терапія відстрочує час виникнення процесів втоми в алкоголізованому м'язі і є найбільш ефективною при тривалому характері розвитку алкогольної міопатії. Отримані дані дають можливість стверджувати, що застосування водорозчинних C_{60} фулеренів запобігає негативному впливу активних форм кисню на клітинні та субклітинні структури при розвитку алкогольної міопатії у щурів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати вказують на перспективну використання водорозчинних C_{60} фулеренів, як потужних антиоксидантів, для корекції патологічних станів м'язової системи, викликані хронічною алкогольною інтоксикацією.

Особистий внесок здобувача. Участь у формулюванні мети і завдань роботи, аналіз та обробка літературних даних, виконання експериментальних досліджень, статистичний аналіз отриманих результатів, узагальнення отриманих даних. Обговорення отриманих результатів та формулювання висновків відбувалося з участю наукового керівника та співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на трьох міжнародних конференціях, (див перелік публікацій вище), а також на наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин ВНУ імені Лесі Українки.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 2 статті у наукових фахових виданнях України, 4 статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus, та 3 тез доповідей на міжнародних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення та висновків. Дисертаційну роботу викладено на 121 сторінках тексту. Вона містить 1 таблицю, 33 рисунки. Перелік використаної літератури включає 155 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Фізіологія скорочення скелетного м'яза

Взаємодія актину і міозину приводить в рух поперечносмугасті і гладкі м'язи, а також лежить в основі багатьох інших видів біологічної рухливості. Скелетний м'яз, в силу своєї регулярної організації на всіх структурних рівнях, є найбільш зручним об'єктом для вивчення механізму роботи актин-міозинового біологічного мотора [23].

Скелетний м'яз складається з пучків паралельно упакованих м'язових клітин або волокон. Характерний діаметр клітини 50-100 мкм, діапазон можливих довжин дуже широкий. Діаметр окремої міофібрили порядку 1 мкм. Саркомери відокремлені один від одного Z-дисками і їх довжина становить 2-3 мкм. Z-диски міофібрил розміщені в м'язовому волокні на одному рівні [24].

Скорочення скелетного м'язу є складним клітинним процесом, у регуляції якого задіяний цілий ряд компонентів. Ініціює скорочення нервовий імпульс, внаслідок чого відбувається вивільнення іонів кальцію з цистерн саркоплазматичного ретикулуму. Іони Ca^{2+} зв'язуються з регуляторними центрами тропоніну С (TnC), які знаходяться в N-доміні молекули і, таким чином, генерують скорочення скелетного м'язу. Вважається, що тропоніновий комплекс передає кальцієвий сигнал на інші білки тонкого філаменту за рахунок сильної Ca-залежної взаємодії між TnC і тропоніном І. На сьогодні відома первинна структура TnC скелетних м'язів багатьох видів ссавців, птахів і деяких безхребетних [25]. Визначено також розташування і кількість Ca-зв'язуючих центрів у молекулі TnC в скелетних м'язах: їх усього чотири. Проведені численні розрахунки константи зв'язування Ca^{2+} з TnC показують, що з цих чотирьох центрів два постійно зв'язані з Ca^{2+} і лише два (І та ІІ) є регуляторними. Більш того, на один іон Ca^{2+} припадає близько 10 молекул TnC, тобто має місце

“дефіцит” Ca^{2+} . Отже, можна припустити, що Ca^{2+} , взаємодіючи з регуляторними центрами I і II TnC скелетного м'язу, служать лише тим “пусковим гачком”, який викликає подальше м'язове скорочення [26, 27, 28].

Поперечно посмуговані м'язові волокна класифікуються на дві групи: фазні волокна і тонічні волокна. Фазні волокна, у свою чергу, поділяються на швидкі та повільні. Фазні м'язові волокна реагують на одиночний стимул від рухового нервового волокна коротким скороченням, тоді як тонічні волокна реагують на тривале скорочення. Потенціал дії фазного м'язового волокна викликає одноразове скорочення. Воно зазвичай починається після закінчення потенціалу дії і триває 200-300 мс. Час між початком потенціалу дії і початком скорочення називається латентним періодом скорочення, який триває 5-10 мс [29].

Збудження швидко поширюється через товщу волокон на відстані понад 10 мкм від сарколеми і синхронізує активність усіх міофібрил. Це відбувається за допомогою спеціальної структурно-функціональної електромеханічної системи зв'язку. Вона складається з сарколеми, T-системи, саркоплазматичного ретикулуму та регуляторних білків тонких протофібрил. T-система складається з великої кількості порожнин у плазматичній мембрані в центрі волокна. Це система поперечних трубочок діаметром близько 0,03 мкм, що простягаються поперечно до осі волокна і розташовані в ділянці диска Z або поблизу перекриття ниток I і A [30].

Залежно від того, чи фіксовані обидва кінці м'яза, чи тільки один, розрізняють ізометричне та ізотонічне скорочення. При ізометричному скороченні розвиток напруги в активованому м'язі не супроводжується його вкороченням. Тому під час ізометричного скорочення довжина м'яза залишається постійною. Під час ізотонічного скорочення м'яз скорочується. В ізометричному режимі одиночний електричний стимул (прямокутний імпульс

тривалістю 0,2-0,5 мс) викликає швидке зростання м'язового напруження, яке, досягнувши максимуму, швидко знижується до нуля. Під час ізотонічного скорочення відбувається укорочення м'язу при постійній нарузі або навантаженні [25].

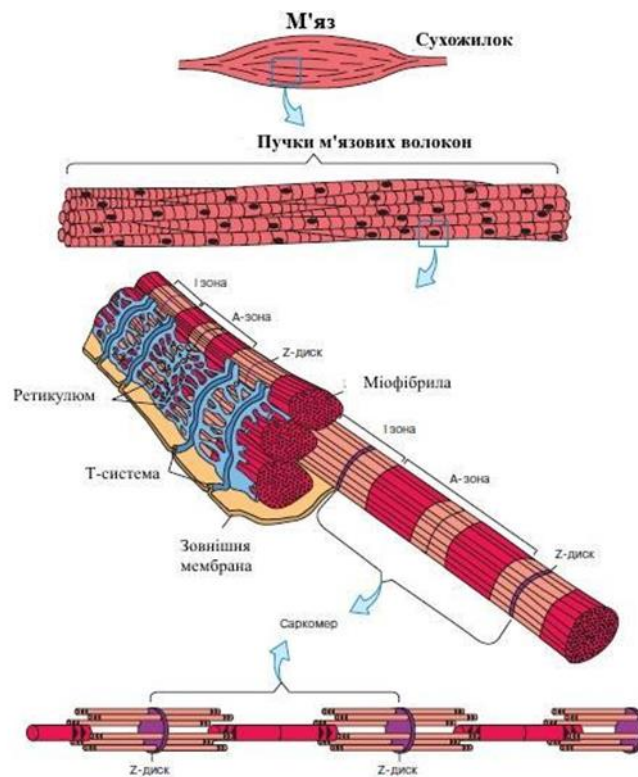


Рис. 1.1. Схематичне зображення основних компонентів поперечносмугастого м'язу.

Якщо до м'яза прикласти одноразовий повторний стимул до того, як він розслабився після попереднього ізометричного скорочення, виникає нове напруження. Це нове напруження накладається на попереднє напруження, так що загальна напруга в м'язі стає більшою, ніж при одноразовому скороченні (механічна сумація). Кілька повторюваних стимулів із заданою частотою також

супроводжуються накладеними скороченнями. В результаті загальне напруження м'яза складається з певного тонічного компонента (за рахунок часткової сумації окремих скорочень) і повторних фазових скорочень. Такий тип скорочення називається тетанус зубчастий [31]. Зі збільшенням частоти стимуляції зубчастий тетанус поступово трансформується в безперервний тетанус, коли окремі фазові скорочення більше не виявляються. Амплітуда тетанічного скорочення, особливо при гладкому тетанусі, завжди значно більша за амплітуду одиночного скорочення [32].

1.2.Регуляція скорочення скелетного м'яза

Нервовими волокнами є відростки нервових клітин разом з оболонками, що покривають їх. Вони підрозділяються на мієлінові і безмієлінові. До складу нервів входять три види волокон – чутливі волокна, соматичні рухові волокна (аксони спінальних мотонейронів) і вегетативні рухові волокна [33].

Залежно від розташування в рефлекторній дузі розрізняють аферентні нейрони (чутливі нейрони), еферентні нейрони (деякі з них також відомі як мотонейрони) та інтернейрони (вставні нейрони). Аферентні нейрони (сенсорні, чутливі або рецептивні нейрони). До цього типу нейронів належать первинні клітини органів чуття, клітини з дендритами, які мають вільні кінці. Мотонейрони (ефекторні, моторні або рухові нейрони). Термінальні нейрони - нейрони цього типу. Асоціативні нейрони (вставні нейрони або інтернейрони) - ця група нейронів здійснює зв'язок між еферентними та аферентними нейронами і поділяється на комплементарні нейрони та проєкційні (мозкові) нейрони [34].

Залежно від товщини, наявності мієлінової оболонки та швидкості поширення збудження вони поділяються на групи А, В і С; група А, в свою чергу, поділяється на підгрупи А-альфа, А-бета, А-гамма і А-дельта. А-альфа нервові волокна є найбільшими мієлінізованими волокнами (клас I) (20 мкм в

діаметрі), зі швидкістю проведення близько 120 м/с. Тонкі мієлінові волокна групи А-дельта і тонкі волокна групи С відповідають за больову чутливість. Більшість цих волокон збуджуються лише при дуже сильній больовій стимуляції. Їх електричне подразнення викликає больові відчуття. При їх блокаді больова чутливість повністю пропадає. Ці волокна також іннервують шкіру, глибокі тканини і внутрішні органи. Деякі тканини – наприклад, рогівка – забезпечені лише волокнами даних груп [35].

Аксони мотонейронів, розташованих в передніх рогах спинного мозку (рухові аксони) утворюють синапси з волокнами скелетних м'язів. Завдяки своїй формі вони називаються нервово-м'язовими кінцевими пластинками або моторними бляшками. Вони мають всі типові морфологічні характеристики хімічних синапсів [36]. Основна функція синапсів і нервово-м'язових з'єднань полягає в передачі імпульсів від рецепторів до ефektorів [37].

Проведення нервового імпульсу до м'язової клітини має ряд особливостей:

1. Однонаправленість передачі – нервові імпульси передаються лише від пресинаптичної мембрани до постсинаптичної мембрани, що обумовлене будовою хімічного синапсу. Таким чином, синапс працює за принципом клапана, що забезпечує надійність роботи нервової системи.

2. Посилення – оскільки мембрани пре- і постсинаптичної області відокремлені один від одного синаптичною щілиною, електрична передача збудження практично неможлива із-за значної втрати струму в позаклітинному середовищі, тому хімічна передача є необхідним підсилюючим механізмом, що підсилює чутливість системи.

- 3 Адаптація - за безперервної стимуляції кількість медіаторів, що виділяються в синапсі, поступово зменшується, доки не вичерпаються їхні запаси, після чого передача подальших сигналів гальмується.

4. Інтеграція - постсинаптичний нейрон може отримувати сигнали від великої кількості збуджувальних і гальмівних пресинаптичних нейронів. Це явище називається синаптичною конвергенцією. У цьому випадку постсинаптичний нейрон здатний інтегрувати сигнали від усіх пресинаптичних нейронів.

5. Дискримінація - часова сумація в синапсі дозволяє фільтрувати слабкі імпульси.

6. Гальмування – проведення імпульсів через синапси і нервово-м'язові з'єднання може загальмовуватися певними блокуючими агентами. Спостерігається пресинаптичне гальмування і постсинаптичне гальмування [38].

Скелетні м'язи іннервуються мотонейронами – руховими нейронами передніх рогів спинного мозку. У передніх стовпах сірої речовини спинного мозку залягають рухові нейрони, створюючи ядра, що є руховими соматичними центрами. Їх аксони виходять у складі передніх корінців, а потім спинномозкових нервів і прямують на периферію, іннервуючи скелетні м'язи. Спинномозкові або спінальні нерви беруть початок в спинному мозку і виходять з нього між сусідніми хребцями майже по всій довжині хребта. У їх склад входять і сенсорні нейрони, і моторні нейрони, тому їх називають змішаними нервами. Змішані нерви – передають імпульси як від центральної нервової системи до периферії, так і у зворотному напрямку. Це дозволяє змінювати дію пресинаптичного нейрона за допомогою сигналів, що поступають від іншого нейрона [31,32]. Менші за розміром гамма-мотонейрони іннервують інтрафузальні м'язові волокна. Активація гамма-мотонейронів збільшує розтягування м'язових веретен, тим самим полегшуючи сухожильні рефлекси, що замикаються через альфа-мотонейрони. Кожен м'яз іннервується кількома сотнями альфа-мотонейронів. Альфа-мотонейрони, в свою чергу, іннервують

багато м'язових волокон - близько 20 у зовнішніх м'язах очей і сотні в м'язах кінцівок і тулуба. У нервово-м'язових синапсах вивільняється ацетилхолін [32].

Пряме постсинаптичне інгібування альфа-моторних нейронів здійснюється клітинами Реншоу - гальмівними вставними нейронами, розташованими в передніх рогах спинного мозку. Однією з найважливіших функцій клітин Реншоу є стабілізація частоти імпульсації мотонейронів при підтримці пози або підтримці навантаження. Клітини Реншоу закінчуються гальмівними синапсами на мотонейронах. У клітинах Реншоу відсутня гіперполяризація, тому вони можуть генерувати цілу серію імпульсів з дуже високою частотою, до 1500 імпульсів в секунду в синаптичному потенціалі. Кожен з цих імпульсів, коли досягає мотонейронів, викликає в них гальмівну відповідь, яка сумується до тих пір, поки триває розряд клітини Реншоу [33].

У стовбурі головного мозку виділяють три рухові центри, тобто три нервові утворення, що безпосередньо впливають на рухові рефлекси спинного мозку і нервів і входять до складу аферентних шляхів від вище розміщених рухових відділів – червоне ядро головного мозку, вестибулярні ядра головного мозку (зокрема латеральне вестибулярне ядро Дейтерса головного мозку) і деякі відділи ретикулярної формації головного мозку [34].

Червоне ядро розташоване в середньому мозку на рівні чотирьохгорбикового тіла. Головним еферентним шляхом від нього служить руброспінальний тракт, що перехрещується відразу після виходу з червоного ядра і що спускається в білій речовині спинного мозку. Електричне подразнення руброспінального тракту супроводжується переважно збудженням мотонейронів згиначів. Від латерального вестибулярного ядра Дейтерса починається вестибулоспінальний тракт, що надає збуджуючу дію на мотонейрони розгиначів і гальмівне на мотонейрони згиначів [36,35]. Тіла коркових мотонейронів розташовані в V шарі кори. Більшість з них

сконцентрована в первинній моторній зоні (у полі 4 по Бродману), і додатковій моторній зоні (поле 6). Значно менше мотонейронів в первинній області (поля 3, 1 і 2) і верхній тім'яній часточці (поля 5 і 7). Первинна моторна зона кори організована соматотопічно: у нижній частині звивини розташовані нейрони, які керують м'язами обличчя; вище – нейрони, які керують м'язами рук; м'язи ніг представлені в пара центральній частці, на медіальній поверхні півкуль [31,36].

1.3. Алкоголь-індуковані пошкодження скелетних м'язів.

У випадку надмірного споживання алкоголь можна розглядати як харчовий токсин [37], який, поряд з іншими важкими патологічними наслідками, такими як цироз печінки, спричиняє метаболічні, фізіологічні й структурні зміни у м'язовій тканині [38]. Вони характеризуються як алкогольна міопатія та описуються спеціально запропонованим терміном – алкоголь-індуковане пошкодження м'язів: гостра некротична міопатія, гостра гіпокаліємічна міопатія, хронічна алкогольна міопатія (ХАМ), асимптомна міопатія, алкогольна кардіоміопатія [39]. Отже, алкогольна міопатія – це синдром, який розвивається у м'язах під час зловживання алкоголем і супроводжується метаболічними, фізіологічними й структурними змінами у м'язовій тканині [40].

Сьогодні алкогольну міопатію розглядають як самостійну нозологічну одиницю, яка одночасно може поєднуватись із алкогольною поліневропатією. В цілому, алкогольна міопатія розвивається незалежно від інших проявів алкогольної хвороби (АХ) (захворювання, під час якого тривала алкогольна інтоксикація призводить до появи характерних структурних змін в органах і системах організму, які проявляються відповідною клінічною симптоматикою, таких як пошкодження печінки, міокарда, синдром мальабсорбції [41] й діагностується в 1/3-2/3 алкоголь-залежних людей [42].

В рамках АХ виокремлюють дві основні форми пошкодження скелетних

м'язів: гостру алкогольну міопатію (ГАМ) і ХАМ [43]. ГАМ діагностується в 1-5 % клінічних інцидентів (найчастіше в чоловіків, зазвичай, після важкого запою [42] і супроводжується м'язовою слабкістю, переважно в проксимальних групах, іноді у процес залучаються бульбарні та мімічні м'язи. Пошкоджуються виключно м'язові волокна типу I. Алкогольний рабдоміоліз міоцитів типу I розвивається впродовж кількох годин або днів [44]. Його ознаками є різкий біль та набряк пошкоджених м'язів, значне підвищення рівня креатинфосфокінази (КФК) в плазмі крові, міоглобінурія, внутрішньоклітинний набряк м'язових волокон, їх гострий некроз та руйнування. Тому, ця форма ГАМ розглядається як гостра некротична міопатія [45].

Гостра гіпокаліємічна міопатія – характеризується загальною м'язовою слабкістю, значним підвищенням рівня КФК й зниженням рівня K^+ в плазмі крові до 1,4-2,1 ммоль / л (норма 3,6 - 6,3 ммоль / л) і некрозом міоцитів [45].

Асимптоматична міопатія – характеризується відсутністю суб'єктивних відчуттів болю й клінічних ознак м'язової втоми, попри наявний високий рівень КФК в плазмі крові [42] й виключну атрофію волокон типу II.

Хронічна алкогольна міопатія – найчастіше діагностована (40 - 60%) клінічна форма АМ [43]. Вона розвивається впродовж кількох тижнів або місяців і характеризується рівномірним статевим розподілом в популяції. Її ознаками є слабкість м'язів тазового [42] і плечового поясу ускладненням ходьби, міалгія, схуднення, атрофія м'язових волокон, здебільшого, типу II - В [46] II - X найбільше реагує на гіпертрофію [42] й часто з ознаками їх денервації. Загальна втрата м'язової маси може становити більше 30 % [47]. Рівень КФК в плазмі крові, зазвичай, не перевищує норму [45]. При цьому, відсутня міоглобінурія і можуть бути відсутні видимі ознаки слабкості волокон типу II - В. Одночасно запускаються компенсаторні механізми регенерації пошкоджених волокон які досягають значної ефективності після відмови від вживання

алкоголю. Втім, відновлення відбувається повільно. Цей симптомокомплекс відрізняє ХАМ від ГАМ і двох вище згаданих типів прогресуючих міодистрофій [48].

Отже, АМ – це складний і багатокомпонентний синдром в патогенезі якого ключову роль має міотоксичний вплив алкоголю (МВА), який пошкоджує м'язи на різних ультраструктурних і системних рівнях їх організації.

1.4. Патологічні ознаки алкогольної міопатії.

Етанол (C_2H_5OH) та його метаболіти (ацетальдегід (C_2H_4O) і ацетат ($C_2H_4O_2$)), зокрема, C_2H_4O ініціюють розвиток АМ [49]. Чимало дослідників вважають, що C_2H_6O і C_2H_4O безпосередньо пошкоджують скелетні м'язи [50]. Сьогодні АМ вважають багатофакторним синдромом [51] під час якого запускається патологічна послідовність реакцій та механізмів, які призводять до розвитку алкогольних міодистрофій різного ступеня важкості. В цілому, результатом МВА є ультраструктурна дезорганізація міоцитів та метаболічно високоактивних органел цитозолу [48, 52], втрата маси м'язів [53], погіршення їх скоротливої здатності [54] та зменшення сили [55], міалгія [56], міоглобінурія [57] і ускладнення локомоторної активності [58, 59]. Загалом, цей симптомокомплекс характеризує АППМ, яке є відносно селективним щодо гістогенетичних типів міоцитів.

Вважається, що АМ має селективний характер атрофічного процесу в м'язах [60], оскільки було з'ясовано, що волокна типу II є найчутливішими до МВА [42], який призводить до атрофії ізоформ ВЛМ: I - В, II - Х і II - В [61]. Поміж волокон типу II, гістогенетичний тип міоцитів II - В / II - Х [42] найменш резистентний до МВА [43,45].

В цілому, ультраструктурна атрофія волокон типу I відбувається тільки

під час важких форм АМ і супроводжується атрофією ізоформи ВЛМ I - В (на що вказує зменшення рівня її мРНК в гомогенатах м'язів), та зменшенням вмісту тропоніну - С [42]. На початкових етапах її розвитку активізуються механізми компенсаційної гіпертрофії, які обмежують атрофічний процес в анаеробних м'язових волокнах. Сьогодні з'ясовано, що під час розвитку АМ, особливо ХАМ, в патологічний процес поступово залучаються різні групи скелетних м'язів. При цьому, прогресивно зменшується їхня маса. Проте, фізіологічно низькі концентрації алкоголю не спричиняють помітних змін в структурі й масі скелетних м'язів [40].

Отже, основним чинником резистентності м'язових волокон до МВА є їх гістогенетичний тип. Відтак, від переважаючого співвідношення міоцитів типу I або II у частці всіх м'язових волокон в м'язі буде залежати характер АПМ, який, в свою чергу, залежить від тривалості МВА.

1.5. Зменшення швидкості синтезу м'язових білків і втрата м'язової маси.

Власне C_2H_6O [62] і C_2H_4O є потужними інгібіторами синтезу м'язових білків. C_2H_4O навіть в низьких дозах здатний незалежно пригнічувати базальний білковий синтез. У віковому аспекті спостерігається чіткий градієнт чутливості до метаболічних ефектів алкоголю [63]. Попри це, його інгібіторний вплив на швидкість синтезу м'язових протеїнів є дозозалежним [64]. Загалом, основою алкогольної атрофії скелетних м'язів є дисбаланс у синтезі й протеолізі структурних білків міоцитів [65]. Проте, основним її фактором є зниження інтенсивності синтезу білків, тоді як протеолітична активність майже не змінюється. Втім, на деяке її прискорення вказують екскреція креатиніну і збільшення виділення N_2 з сечею. Висловлюються припущення, що C_2H_6O , попри незмінну інтенсивність протеолізу, може вибірково пошкоджувати

скоротливі білки м'язових волокон, наприклад міозин.

Загалом, швидкість білкового синтезу зменшується на 15 - 20% уже через 24 год після вживання алкоголю [42,44,46], при цьому, в обох типах м'язових волокон: I і II. Також повідомляється про зменшення інтенсивності синтезу неміофібриллярних (саркоплазматичних) білків. Вважається, що ХАМ оборотна, оскільки, дефіцит синтезу білка нормалізується через 72 год після припинення вживання алкоголю [38]. Втім, окремі клінічні дослідження доводять необоротність патогістологічних і метаболічних змін у м'язовій тканині [42,43]. У пацієнтів з хронічним алкоголізмом зменшується частка загально-го синтезу білків тіла (від 27 до 15%), а деякі з них можуть втратити близько 30% їх загальної м'язової маси [42]. Втрата м'язової маси є безпосереднім результатом атрофії м'язових волокон (їх діаметр становить 80 % від норми без змін їх кількості [66]. Іншим поясненням інтенсивного атрофічного процесу у м'язах може бути пригнічення диференціювання міоцитів у міотуби [67] й виникнення в м'язах резистивності до інсуліну внаслідок порушення трансдукторних шляхів інсулінової сигналізації. Загалом, атрофії передують як зменшення відносної маси м'язових протеїнів: міозину, десміну, актину і тропоніну, титіну й небуліну (ускладнює взаємодію актину й міозину), так і зниження інтенсивності їх синтезу.

Отже, порушення механізмів клітинних адаптацій та міогенезу є передумовою депресії компенсаторної регенерації міоцитів. Внаслідок цього, у зрілих м'язах інтенсивно розвивається атрофічний процес, якому сприяє зменшення інтенсивності синтезу м'язових білків. Це призводить до зменшення загальної м'язової маси, яке відбувається в зв'язку з патологічною зміною структурного метаболізму в міоцитах і м'язовій тканині загалом.

1.6. Порушення про-антиоксидантного балансу при розвитку алкогольної міопатії.

Етанол вважається токсичною речовиною, він викликає прямі і непрямий вплив на органи і системи, що призводить до алкогольної міопатії. Метаболізм алкоголю тісно пов'язаний з ферментами, що беруть участь в окислювальному стресі та генерації ROS, наприклад супероксид ($O_2^{\bullet-}$) і перекис водню (H_2O_2), які викликають пошкодження клітин [68]. Окислювальний стрес можна вважати наслідком дисбалансу в утворенні активних форм кисню (АФК) і системах антиоксидантного захисту, в яких мітохондрії є основним джерелом продукції АФК. Основне значення полягає в тому, що високі рівні АФК можуть модулювати молекулярні та структурні модифікації та призводити до функціональних змін у м'язах.

У зв'язку з цим АФК викликає окислення біомолекул, що призводить до втрати їх біологічних функцій і призводить до гомеостатичного дисбалансу. Основні ефекти, опосередковані АФК, пов'язані з їх можливістю викликати окисне пошкодження клітин і тканин [68]. Алкоголь переважно метаболізується до ацетальдегіду алкогольдегідрогеназою та цитохромом р450 2E1 (CYP_{2E1}) у печінці. Окислення алкоголю CYP_{2E1} порушується при хронічному зловживанні алкоголем і, як було показано, утворює велику кількість активних форм кисню (АФК) [69]. Метаболізм алкоголю, вироблення АФК, порушення антиоксидантних механізмів і зміни окислювально-відновного стану клітин — усе це добре відомі агенти пошкодження тканин у кількох системах органів [70,71].

У щурів, які постійно споживали алкоголь, спостерігалось зниження активності кількох антиоксидантних систем, включаючи загальний і вільний рівні глутатіон, активність глутатіонредуктази, активність глутатіонпероксидази та активність супероксиддисмутази-2 [72]. Крім того,

скелетні м'язи виявляють підвищену карбоніляцію білка [73], а також підвищений вміст гідропероксиду холестерину та малонового діальдегіду [74], які вказують на окисне пошкодження. Це збільшення окислювального стресу сприяє деградації білка, включаючи підвищену експресію системи UPR (убіквітин-протеасомний шлях) у м'язових волокнах [74], а також збільшує експресію атрогін-1 та TGF- β 1. Ці фактори працюють разом, сприяючи деградації білка та, швидше за все, погіршенню регенерації, що призводить до втрати м'язів.

Окислювальне пошкодження може мати місце або через збільшення утворення вільних радикалів або зниження активності антиоксидантних систем. У алкоголіків відмічене надмірне вироблення реактив форм кисню мітросомальною системою та мітохондріями [75]. Пошкодження мітохондрій порушує окислення жирних кислот і підвищує перекисне окислення ліпідів. У клінічному дослідженні виявлено мітохондріальне пошкодження м'язів часто спостерігається (28%) у 57 алкоголіків, з яких більшість недоїдали [76]. Мітохондріальні функціональні порушення можуть бути пов'язані зі збільшенням генерації супероксид-аніону, що потенційно є важливим фактором окисного пошкодження.

Активність антиоксидантних систем також має велике значення в патогенезі міопатії, зокрема через надлишок вільних радикалів, в зростає активність таких антиоксидантних систем як супероксиддисмутаза (СОД), глутатіон пероксидаза (GPX), каталаза, а також карнозиназа, аскорбінова кислота, бета-каротин, альфа-токоферол та ін. Активність м'язової SOD і GPX, а також малонового діальдегіду (MDA) було визначено в дослідженні на 64 щурах, яких годували 5 тижнів з моделлю Lieber-deCarli. З цих щурів 32 отримали, крім того, 227 мг сульфату цинку. Щури, яких годували етанолом продемонстрували збільшення SOD, GPX і MDA що корелювало із вмістом

заліза в м'язах і атрофією волокон типу IIb [77]. Дієта з низьким вмістом білка показала відсутність залежностей між рівнем MDA, атрофію волокон типу IIa та типу IIb. Додавання етанолу до дієти тварин, яких годували з низьким вмістом білка, збільшило MDA, атрофію волокон типу IIa та маргінальні ефекти волокон типу IIb ($F = 3,7$, $p = 0,058$). Однак, лікування цинком не зменшило атрофію м'язів, хоча знизило рівень MDA. Цинк, марганець, мідь і селен є факторами антиоксидантних ферментів, тоді як накопичення заліза може сприяти перекисному окисленню [78].

Також існує думка щодо ролі антиоксидантів у змінах м'язів, які спостерігаються у хворих на алкоголізм. Уорд і Пітерс [79] описали значне зниження у плазмі крові рівнів токоферолу і селену у алкоголіків зі скелетною міопатією. З іншого боку, [80] Fernandez-Sola не виявив зниження рівня у сироватці крові та м'язах таких антиоксидантів як альфа-токоферол, аскорбінова кислота і ретинол у хворих на алкоголізм при міопатії. Інші дослідження показали лише незначні зміни вмісту антиоксидантних ферментів, не пов'язана з наявністю міопатії [81]. У сукупності ці дані свідчать про те, що підвищене перекисне окислення ліпідів пов'язане з атрофією м'язів і що сироваткові рівні деяких антиоксидантів можуть бути пов'язані з збільшенням маси та сили м'язів, але, в цілому, терапевтичних результатів використання антиоксидантів не дає.

Цілком ймовірно, що під час ХАІ АФК можуть призвести до переважного пошкодження м'язових волокон II типу, оскільки концентрація деяких антиоксидантних ферментів у них нижча, аніж у волокнах типу I. Було з'ясовано, що в змішаних м'язах (мають рівномірне співвідношення гістогенетичних типів міоцитів I і II) немає жодних пошкоджень, які були б спричинені гіперактивністю АФК. Проте, алкоголь знижує здатність міоцитів типу I протистояти пошкодженню білків гідроксильними радикалами.

Висловлено припущення, що її причиною, окрім змін будь-якого з компонентів антиоксидантної системи, може бути й процес, механізм якого ще не з'ясований.

1.7. М'язові втома і слабкість, як результат змін при алкогольній міопатії.

В людей, які зловживають алкоголем, м'язова дисфункція розвивається незалежно від віку особи й терміну зловживання алкоголем [12,15]. Безпосереднім наслідком МВА є погіршення скоротливої здатності м'язів [3,4] та зменшення їх сили. Причиною цього є як безпосередня ультраструктурна дезінтеграція міоцитів під час ГАМ та їх атрофія під час ХАМ так і зміни електролітичного гомеостазу й біоелектричної активності у зв'язку з цим. Втім, фізіологічно низькі концентрації алкоголю не будуть призводити до м'язової дисфункції [82]. Перш за все, гіперутворення вільних радикалів у дисфункціональних мітохондрях, призводить до руйнування мембранних структур міоцитів та порушень в роботі й функціях їх ферментних систем: зниження активності Na^+/K^+ - АТФ-ази і підвищення – Ca^{2+} -АТФ-ази. Пригнічення активності Na^+/K^+ - АТФ-ази інгібує специфічне збільшення Na^+ провідності, яке відбувається у відповідь на адекватний подразник і таким чином перешкоджає розвитку збудження у міоцитах шляхом генерації ПД. Втім у фізіологічно низьких концентраціях алкоголю зміни мембранного потенціалу спокою незначні, а висхідна фаза розвитку ПД не зазнає змін.

Проте $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ здатний фізично взаємодіяти з мембранами міоцитів, порушуючи їх функцію [78]. Прикладом безпосереднього впливу алкоголю на компоненти мембрани міоцитів є порушення електромеханічного sprzęження збудження-скорочення (З-С). Було з'ясовано, що $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ інгібує звільнення Ca^{2+} із СР у міофібрилах посмугованих скелетних м'язів миші, які були піддані експозиції алкоголем і таким чином перешкоджає розвитку збудження [83]. Цей

гострий ефект C_2H_6O спричинений, в основному, пригніченням виходу сарколемального Ca^{2+} через потенціалзалежні Ca^{2+} канали і розглядається в якості можливої причини м'язової слабкості під час АІ [83]. Однак, повідомляється про збільшення концентрації вільного саркоплазматичного Ca^{2+} в м'язових волокнах під час АІ [83]. Таке його збільшення в міоцитах залежить від їх гістогенетичного типу і призводить до порушення механізмів Ca^{2+} -опосередкованої сигналізації: пригнічується здатність Ca^{2+} зв'язуватись із тропоніном С і Ca^{2+} - залежне спряження збудження-скорочення.

Механізм цього явища може бути наступним. Зазначається, що фізичні навантаження у стані алкогольного сп'яніння сприяють Ca^{2+} індукованому вивільненні Ca^{2+} (КІВК) із СР. З'ясовано, що КІВК посилюється експозицією C_2H_6O СР скелетних м'язів кролів і жаби. Втім, безпосередньо, C_2H_6O не здатний спричинити звільнення Ca^{2+} із СР. Загалом, звільнений таким чином Ca^{2+} створює надлишок іона в саркоплазмі та при-зводить до утворення вільних радикалів, зокрема H_2O_2 , який в низьких концентраціях (10-100 мМ) активує потенціал-залежні Ca^{2+} -вивільнюючі канали і є агоністом C_2H_6O [82]. Відтак, H_2O_2 може патологічно, але не у фізіологічних умовах індукувати звільнення Ca^{2+} з СР], втім, сам гідроксильний радикал здатний спричинити короткочасне потенціювання сили довільних м'язових скорочень.

Отже, погіршення скоротливої здатності міоцитів, одночасно з ультра-структурною дезорганізацією міофіламентів і структурною дезінтеграцією самих клітин та їх атрофією є причиною слабкості м'язів під час АМ різного ступеня важкості.

Загалом, суб'єктивне відчуття парестезії і клінічні ознаки м'язової втоми й ускладнення локомоторної активності залежать від форми АМ. Під час ГАМ, м'язова слабкість проявляється в проксимальних групах м'язів. При цьому, характерною є різка парестезія. Результати голкової міографії можуть бути

нормальними або вказувати на денерваційну активність у вигляді потенціалів фібриляцій і зменшення амплітуди й тривалості ПД рухових од-ниць. Під час гострої гіпокаліємічної міопатії, м'язова слабкість має генералізований характер, відчуття парестезії і набряк м'язів відсутні. Будь-які скарги від пацієнтів і клічні ознаки м'язової слабкості відсутні під час асимптоматичної алкогольної міопатії. В цілому, слабкість м'язів і загальне виснаження найбільш характерні для ХАМ, яка супроводжується розвитком проксимальних парезів і м'язової слабкості з чітким ускладненням локомоції [79, 80].

От же, алкоголь – це речовина, якою на побутовому рівні зловживають найчастіше, а АМ – це найзагальніший клінічний прояв пошкодження й дисфункції міоцитів, які спричинені МВА різного ступеня важкості й тривалості на різних рівнях структурної і системної організації м'язових волокон. Проте, ступінь структурної дезорганізації міоцитів та супутніх системних розладів залежить, насамперед, від співвідношення гістогенетичних типів м'язових волокон в їх загальній частці в структурі окремого м'яза, які власне й визначають резистентність міоцитів до МВА.

Втім, інші фактори, такі як важкість і тривалість АІ, також не менш важливі та є передумовою розвитку і перебігу тих патофізіологічних процесів і послідовностей реакцій енергетичного й структурного метаболізму, і реакцій гомеостазу, які спричиняють безпосередні макро- й ультраструктурні пошкодження м'язової тканини. Свій міотоксичний вплив алкоголь здійснює в напрямку створення гормон-стійких станів у організмі й порушення механізмів клітинних адаптацій і міогенезу та розвитку атрофії міоцитів; порушення гомеостатичної рівноваги у м'язовій тканині загалом і в міоцитах; ультраструктурної де-градації міоцитів.

Реалізація МВА в цих напрямках призводить до ультра-структурної дезінтеграції м'язових волокон (у випадку ГАМ) та міодистрофії (у випадку

ХАМ), змін пероксидантно-антиоксидантного балансу, електролітичного гомеостазу й енергетичного і структурного метаболізмів. Ці патологічні прояви МВА характеризують АМ як симптом і призводять погіршення здатності м'язових волокон до скорочення й загальної (найчастіше проксимальної) м'язової слабкості та локомоторної дисфункції, про-явами якої є парези та міалгія.

1.8. C₆₀ фулерен: структура та біологічна активність

Молекули фулеренів – це замкнені структури у формі порожнистої сфери, еліпсоїда або трубки, поверхня яких складається з шестичленних та п'ятичленних циклів з атомами вуглецю у вершинах. Загальна парна кількість атомів вуглецю у складі молекули може бути різною - 60, 70, 76, 78, 82 і т. д. Значну зацікавленість серед великої родини фулеренів викликають C₆₀, молекула яких має найвищий ступінь симетрії і є найбільш стабільною. Поверхня молекули C₆₀ складається з 20 правильних гексагонів і 12 пентагонів, об'єднаних кон'югованою π-електронною системою (рис. 1,2) [84,85]. Усі кільця злиті між собою, зокрема між сусідніми гексагонами є подвійні зв'язки, а між сусідніми гексагонами і пентагонами – одинарні [86].

Площа поверхні молекули C₆₀ втричі менша, ніж очікувана для біологічної молекули такої ж молекулярної маси (720 Да), а її діаметр становить лише 0,714 нм, тобто близький до діаметра α-спіралі поліпептидів або молекул стероїдів, що сприяє її здатності вбудовуватися в клітинну мембрану, локалізуватися поблизу фосфоліпідів і мембранних білків та взаємодіяти з

активними центрами ензимів [87].



Рисунок 1.2. Структура молекули C_{60}

Молекула C_{60} є досить сильним електронним акцептором, яка може приєднувати від 1 до 6 електронів [88]. Саме подвійні зв'язки у каркасі C_{60} фулерену є електронодефіцитними, що й зумовлює електронно-акцепторні властивості молекули та її здатність легко приєднувати реагенти, які містять неспарений електрон (вільні радикали). Варто зазначити, що найбільшою антиоксидантною активністю володіють нативні, хімічно немодифіковані молекули C_{60} . Їх хімічна модифікація супроводжується розривом подвійних зв'язків, зниженням електронно-акцепторних і прояву антиоксидантних властивостей фулеренового каркасу [89].

Основною перевагою використання C_{60} фулеренів як антиоксидантів є їхня здатність локалізуватися всередині клітини у мітохондріях [90,91] та інших органелах, у яких, за патологічних станів, відбувається утворення вільних радикалів. Так, за допомогою флуоресцентної мікроскопії та моноклональних антитіл виявлено, що водорозчинні сполуки $C_{60}(CO_2H)_2$ здатні проникати крізь плазматичну мембрану фібробластів людини, де зв'язуються переважно з мітохондріями [92]. Автори пояснюють це подібністю між структурою молекули C_{60} та вкритих клатриною граткою везикул, які клітина поглинає шляхом ендоцитозу.

Дослідження з використанням сканувальної та електронно-трансмисійної мікроскопії показали, що немодифікований C₆₀ фулерен проникає у клітини моноцитарних макрофагів людини: при цьому він знаходиться не лише вздовж плазматичної мембрани, але й накопичується у цитозолі, ядрі та біля його зовнішньої мембрани [93]. Експерименти з використанням флуоресцентних зондів, вбудованих у бішар фосфатидилхолінових ліпосом, показали, що при взаємодії комплексу C₆₀-полівінілпіролідолу з ліпосомами відбувається його руйнування. При цьому молекули C₆₀ вільно дифундують у мембрану, що призводить до зміни в'язкості мембранних ліпідів [94]. При взаємодії C₆₀ фулерену з ліпосомальним бішаром спостерігається зменшення діаметра ліпосом і збільшення його поверхневого заряду [95]. За допомогою методу молекулярної динаміки встановлено, що C₆₀ фулерени можуть потрапляти у ліпідну основу мембрани шляхом пасивної дифузії. За низьких концентрацій (10⁻⁴-1 мг/мл) модифіковані флуоресцентною міткою C⁶⁰ фулерени взаємодіють зі штучною бімолекулярною ліпідною мембраною, збільшуючи її питому провідність і електричну ємність, та проникають крізь плазматичну мембрану. При цьому вони утворюють у ній локальні дефекти у вигляді пор чи каналів [96].

На сьогодні зібрано декілька даних про здатність фулеренів C₆₀ нейтралізувати гідроксильні радикали та супероксид-аніони [97], які є основним патогенетичним фактором ушкодження м'язової тканини. Вільні радикали індукують перекисне окислення ліпідів, пригнічують ферменти дихального ланцюга мітохондрій та активність АТФ-ази, інактивують гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу та натрієві канали плазматичної мембрани тощо. [98, 99,100]. Відомо також, що вищезгадані наночастинки здатні впливати на запальний процес через систему макрофагів.

Експерименти *in vitro* показали, що похідні фулерену C₆₀, поглинуті макрофагами, викликають вивільнення протизапальних цитокінів [101].

Продемонстровано антигістамінну та антиоксидантну дію похідних полігідроксифулерену C₆₀, що, на думку авторів, є перспективним для лікування таких захворювань, як астма, поліартрит, хвороби серця та розсіяний склероз [102].

Отже, завдяки унікальній наноструктурі та біосумісності, C₆₀ фулерену притаманна специфічна біологічна активність: мембранотропність та потужна антиоксидантна дія, що відкриває перспективу його використання для розробки нових підходів у терапії порушень організму, зумовлених надмірним утворенням вільних радикалів.

1.9. Активність антиоксидантних систем в процесі розвитку алкогольної міопатії

Окислювальне пошкодження може мати місце або через збільшення утворення вільних радикалів або зниження активності антиоксидантних систем. У алкоголіків відмічене надмірне вироблення реактив форм кисню мікросомальною системою та мітохондріями [103]. Пошкодження мітохондрій порушує окислення жирних кислот і підвищує перекисне окислення ліпідів. У клінічному дослідженні виявлено мітохондріальне пошкодження м'язів часто спостерігається (28%) у 57 алкоголіків, з яких більшість недоїдали [104]. Мітохондріальні функціональні порушення можуть бути пов'язані зі збільшенням генерації супероксид-аніону, що потенційно є важливим фактором окисного пошкодження. Активність антиоксидантних систем також має велике значення в патогенезі міопатії, зокрема через надлишок вільних радикалів, в тому числі супероксиддисмутаза (СОД), глутатіон пероксидаза (GPX), каталаза, а також карнозиназа, аскорбінова кислота, бета-каротин, альфа-токоферол та ін. Активність м'язової SOD і GPX, а також малонового діальдегіду (MDA) було визначено в дослідженні на 64 щурах, яких годували 5 тижнів з моделлю Lieber-

deCarli. З цих щурів 32 отримали, крім того, 227 мг сульфату цинку. Щури, яких годували етанолом продемонстрували збільшення SOD, GPX і MDA що корелювало із вмістом заліза в м'язах і атрофією волокон типу ІІb [105]. Дієта з низьким вмістом білка показала відсутність залежностей між рівнем MDA, атрофією волокон типу ІІa та типу ІІb. Додавання етанолу до дієти тварин, яких годували з низьким вмістом білка, збільшило MDA, атрофію волокон типу ІІa та маргінальні ефекти волокон типу ІІb ($F=3,7$, $p=0,058$). Однак, лікування цинком не зменшило атрофію м'язів, хоча знизило рівень MDA. Цинк, марганець, мідь і селен є кофакторами антиоксидантних ферментів, тоді як накопичення заліза може сприяти перекісному окисленню [106].

Також існує думка щодо ролі антиоксидантів у змінах м'язів, які спостерігаються у хворих на алкоголізм. Уорд і Пітерс [107] описали значне зниження у плазмі крові рівнів токоферолу і селену у алкоголіків зі скелетною міопатією. З іншого боку, [108] Fernandez-Sola не виявив зниження рівня у сироватці крові та м'язах таких антиоксидантів як альфа-токоферол, аскорбінова кислота і ретинол у хворих на алкоголізм при міопатії. Інші дослідження показали лише незначні зміни вмісту антиоксидантних ферментів, не пов'язана з наявністю міопатії [109]. У сукупності ці дані свідчать про те, що підвищене перекисне окислення ліпідів пов'язане з атрофією м'язів і що сироваткові рівні деяких антиоксидантів можуть бути пов'язані з збільшенням маси та сили м'язів, але, в цілому, терапевтичних результатів використання антиоксидантів не дає.

Опосередкована алкоголем порушена біоенергетика не обмежується лише мітохондріями. Хронічний прийом алкоголю призводить до гліколітичних порушень скелетних м'язів у щурів [110]. Наприклад, активність гліколітичних ферментів альдолази, піруваткінази та лактатдегідрогенази значно знижувалася після тривалого введення етанолу [111], що співпадало з результатами у людей

[112]. Навпаки, у білих литкових м'язів у самців щурів спостерігалися протилежні ефекти, що свідчить про потенційний вплив етанолу на тип волокна на активність гліколітичного ферменту [113,114]. Зміни в метаболізмі глюкози, які викликані алкоголем, пов'язані зі зниженням м'язової працездатності в спортсменів, включаючи порушення глюконеогенезу та виходом глюкози, зниженням лактату та гліцерину [115,116] та зі зниженням поглинання глюкози та зберігання глікогену [117].

Раніші дослідження показали, що пошкодження м'язів через хронічний вплив алкоголю не були пов'язані з мітохондріальним дисбалансом обміну речовин у щурів (поглинання кисню та АТФ-азна активність) [118,119] і у людини (поглинання кисню, вміст цитохромів, комплекси дихального ланцюга) Однак, є також дані про міцний зв'язок між пошкодженням скелетних м'язів і дисрегуляцією метаболізм мітохондрій через вживання алкоголю. Зокрема показано, що алкоголь змінює основний енергетичний обмін шляхом зниження співвідношення $NAD^+/NADH$, викликає накопичення проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот і індукує збій у роботі дихального ланцюга [120]. Окислювальний стрес, який може бути причиною або наслідком мітохондріальної дисфункції [121], також є маркером для ушкодження скелетних м'язів, яке викликане алкоголем. У щурів хронічний алкоголь-індукований оксидативний стрес і зниження антиоксидантного потенціалу виявляється у змінах глутатіону (GSH), окисленого глутатіону (GSSG), посиленому перекисному окисленні ліпідів і збільшенні загального окислення білка [122]. Загалом, ці дані демонструють, що окислювальний стрес і мітохондральна дисфункція можуть затримувати регенерацію та відновлення функції м'язів і сприяють пов'язаними з алкоголем дисфункціям. Даний каскад процесів може призводити до розбалансування часу встановлення гладкого тетанусу, зменшенні силової продуктивності м'яза та порушенні взаємодії

м'язових [123].

Таким чином, захисна дія C_{60} фулеренів у вигляді ін'єкції їх водного колоїдного розчину, є перспективною для їх застосування у терапії патологічних ушкоджень скелетних м'язів на фоні хронічної алкоголізації. Можна припустити, що розвиток цього напрямку сприятиме розробці ефективної терапії інших патологічних станів м'язової системи, в основі яких лежить патологічна дія вільнорадикальних процесів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Лабораторні щурі – об’єкт для моделювання хронічної алкогольної міопатії

Для експериментальних досліджень були використані 90 здорових щурів-самців інбредної лінії *Wistar*, віком від 45 до 150 днів від народження, які були вирощені й утримувались у віварії ННЦ «Інститут біології та медицини», Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Протокол дослідження був затверджений комісією з питань біоетики ВНУ імені Лесі Українки (Протокол № 3 від 20 грудня 2020 року) згідно з правилами “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях” (Страсбург, 1986) [124] і норм біомедичної етики згідно із Законом України №: 3446 - IV 21.02.2006 р., м. Київ, “Про захист тварин від жорстокого поводження” з проведенням медико-біологічних досліджень [125].

Під час проведення хронічного і гострого експериментів усі процедури й хірургічні маніпуляції із тваринами виконувались у нормотермічних умовах в один і той же час доби (з метою уникнення температурних ефектів середовища й ефектів циркадного ритму) з дотриманням умов антисептики й асептики. Тварини перебували у віварії за відповідних умов освітлення, температурного режиму та стандартного раціону.

Тварини, які були обрані для експериментального дослідження, утримувались у стандартних віварних умовах з 12/12 годинним добовим циклом “світло-темрява” з постійною вентиляцією, температурою повітря 26 °C й вологістю 43±2% внутрішнього середовища на змішаній зерново-овочевій дієті. Тварини споживали корм з розрахунку щоденної потреби у споживанні 30

- 35 г їжі на тварину. Раціон був складений з врахуванням енергетичної цінності інгредієнтів корму та вмісту органічних речовин, вітамінів, макроелементів і мікроелементів. У питній воді тварин не обмежували, воду давали щоденно свіжу й чисту.

Клітки щоденно прибирали. Один раз в тиждень їх дезінфікували крутим окропом із 7% розчином їдкого лугу чи 0,5% розчином дезактину, якими зрошували або протирали поверхні клітки.



Рисунок 2.1. Умови утримання піддослідних тварин.

Відходи віварю, тіла щурів та використані фармацевтичні препарати й матеріали і робочі розчини утилізувались згідно з нормами утилізації біологічних відходів та біоматеріалів, і відходів, які утворюються під час медичної та ветеринарної практики й дослідних робіт, відповідно до Закону України «Про відходи» [126].

2. 2. Модель індукції хронічної алкогольної інтоксикації.

У літературі описані декілька варіантів відтворення моделі експериментально-індукованого алкоголізму в щурів [127]. Нами був обраний метод Халілова-Закіхорджаєва, [131] який є найзручніший для індукції хронічної алкогольної інтоксикації у щурів внаслідок ефективності способу введення тварині добового об'єму алкоголю і можливості легко його контролювати.

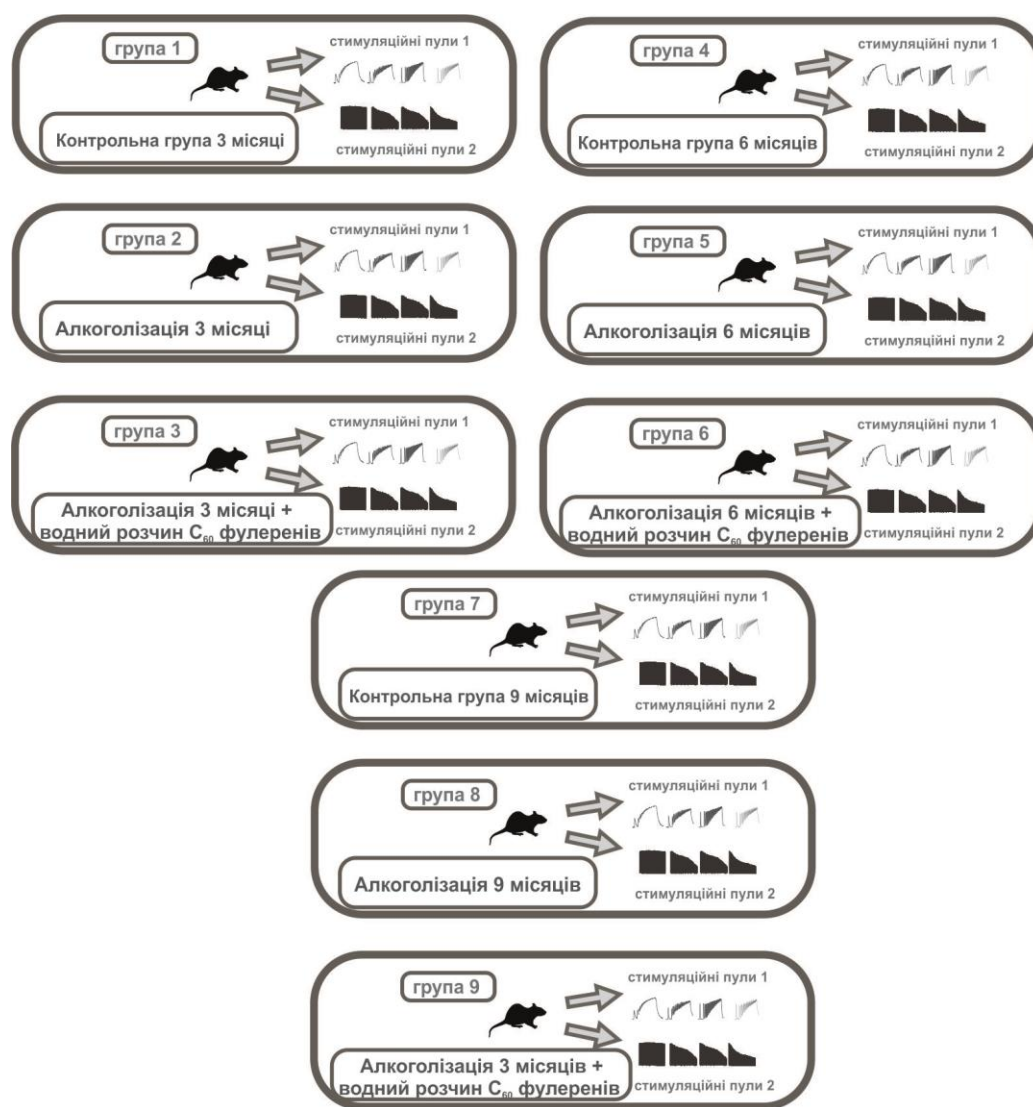


Рисунок 2.2. Схема експерименту.

Тварини, відібрані для експерименту, були розділені на 9 експериментальних груп:

1. Алкоголізація 3 місяці (n=10)
2. Контрольна група 3 місяці (n=10)
3. Алкоголізація 6 місяців (n=10)
4. Контрольна група 6 місяців (n=10)
5. Алкоголізація 9 місяців (n=10)
6. Контрольна група 3 місяці (n=10)
7. Алкоголізація 3 місяці + водний розчин C₆₀ фулеренів (n=10)
8. Алкоголізація 6 місяців + водний розчин C₆₀ фулеренів (n=10)
9. Алкоголізація 9 місяців + водний розчин C₆₀ фулеренів (n=10)

Кожна тварина поміщалася в окрему клітину для отримання 40% етанолу в питній воді [129], що означало, що піддослідні групи не мали доступу до 100% води до споживання дозованої порції етанолу [130]. Контрольна група (n=10) одержувала 100% питну воду. Споживання кількості етанолу розраховували щодо 0,5% маси тіла тварини. Перерахунок дози етанолу проводили кожну добу протягом усього експерименту [131].

Піддослідні тварини груп «Алкоголізація+C₆₀» (n=10 у кожній групі) разом з алкоголем приймали C₆₀ФВР у дозах 1 мг/кг ваги щура. Перерахунок дози C₆₀ФВР проводили кожну добу протягом усього експерименту. Контроль кількості прийнятого C₆₀ФВР здійснювали шляхом відмови доступу тварин до 100% питної води до повного використання ними застосованого препарату.

2.3. Анатомо-гістологічна характеристика *musculus soleus*

Усі експерименти проводилися на *musculus soleus* – повільному м'язі із окисним метаболізмом, [132] оскільки він є чутливим до міопатії, у порівнянні зі швидкими м'язами, зокрема *musculus gastrocnemius*. Різниця пояснюється

метаболическими відмінностями між різними типами м'язових волокон: м'язові волокна, що повільно скорочуються, стійкі до втоми і забезпечують тривалі, дрібні рухи і контроль пози. Вони містять більше мітохондрій і міоглобіну та є аеробними за своєю природою порівняно зі швидкими м'язовими волокнами. Дані волокна також іноді називають волокнами типу I або червоними волокнами через їхнє кровопостачання. М'язові волокна, що швидко скорочуються, забезпечують більші та потужніші зусилля, але протягом коротшого часу і швидко втомлюються. Вони є переважно анаеробними з меншим кровопостачанням, тому їх іноді називають білими волокнами або типом II. Скелетні м'язи містять обидва типи волокон, але їх співвідношення може відрізнитися залежно від різних факторів, включаючи функцію м'язів, вік і тренуваність. У *musculus soleus* переважають волокна типу I [133].

Камбалоподібний м'яз (*musculus soleus*) - це товстий, плоский біцепс з невеликим черевцем. Назва м'яза точно характеризує його форму. Він розташований попереду литкового м'яза (рис. 2.3). Відходить від головки малоюмілкової кістки у вигляді тонкого сухожилля. М'яз опускається вниз, перетворюється на плоске сухожилля, яке з'єднується з сухожиллям литкового м'яза і перетворюється на спільне із вищевказаним м'язом ахіллове сухожилля (*tendo calcaneus*), що прикріплюється до п'яткової кістки.

Досліджуваний м'яз іннервується великоюмілковим нервом, який розташований медіально на кінцівці і є гілкою сідничного нерва. Великоюмілковий нерв тягнеться вздовж стегна, проходить косо через підколінну ямку, позаду підколінних судин і входить між двома головками литкового м'яза: медіальним литковим і латеральним литковим м'язами, розгалужується на три гілки, які прямують поруч із зовнішньою і внутрішньою малоюмілковими артеріями і великоюмілковою артерією каудально.

Перша гілка іннервує *m. plantaris*, *m. soleus* та *MGL*, друга - *MGM*, третя - *m. flexor digiti I longus*, *m. tibialis caud.*, *m. flexor digitorum longus*. М'яз отримує кровопостачання від *a. suralis ext*, гілки підколінної артерії.

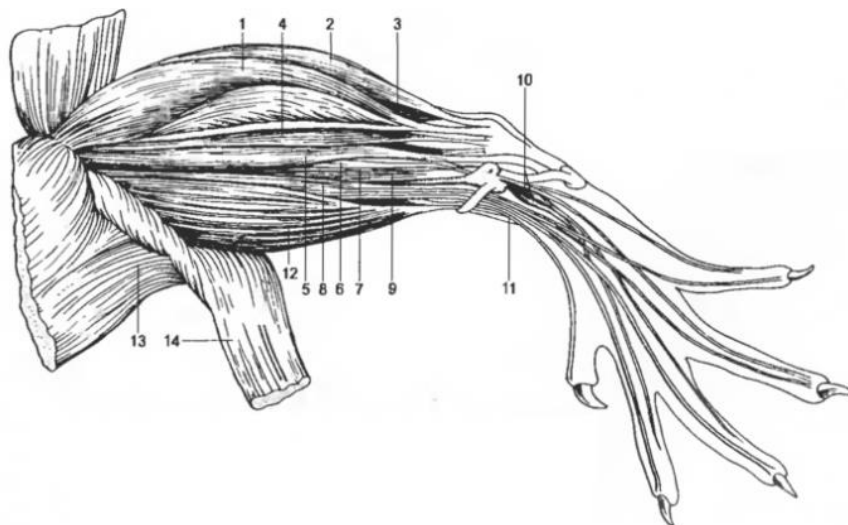


Рисунок 2.3. М'язи латеральної поверхні лівої гомілки і згинальної поверхні стопи: 1 — *m. gastrocnemius* (cap. lat.), 2 — cap. med., 3 — *m. plantaris*, 4 — *m. soleus*, 5 — *m. peroneus* (fibularis) longus, 6 — *m. peroneus digiti V*, 7 — *m. peroneus digiti IV*, 8 — *m. peroneus brevis*, 9 — *m. extensor digitorum longus*, 10 — *m. extensor digitorum brevis*, — *m. extensor digiti 1* (liallueis) longus (proprius), 12 — *m. tibialis cran.*, 13 — *m. biceps femoris* (cap. ant. et accessorium), 14 — cap. post.

2.4. Анестезія, операційне втручання та метод евтаназії.

Наркотичний сон у щурів ініціювали *тіопенталом натрію* (“ARTE-RIUM”, Україна) (40 мг / кг , підтримуюча доза – 30 мг / кг, швидкість введення – 5 - 10 мл / хв., $t - 36 \pm 1^\circ\text{C}$.) після попередньої пре медикації 0,1% атропіном (“ДЗ ГНЦЛС”, Україна) для запобігання виникненню паралітичної асфіксії (0,1 мл за 30 хв перед введенням у наркотичний сон). Глибина сну оцінювалась за силою згинального рефлексу задньої кінцівки під час механічного стиснення великого пальця ступні.

Хірургічні й мікрохірургічні інструменти (“Surgiwell” Пакистан) і матеріали, які використовувались для хірургічних маніпуляцій представлені на рисунку 2.4.



Рисунок 2.4. Хірургічні інструменти і матеріали, які використовувались для хірургічних маніпуляцій: 1 – пінцет хірургічний загального призначення (ПМ - 8); 2 – пінцет анатомічний загального призначення (ПМ - 11); 3 – пінцети мікрохірургічні (ПМ-42-1); 4 – пінцет судинний з атравматичною нарізкою (ПМ - 26); 5 – ножиці: медичні для стрижки волосся під час обробки країв рани (Н - 18); 6 – ножиці з гострими кінцями прямі (Н - 19); 7 – ножиці з гострими кінцями, вертикально зігнуті (Н - 21); 8 – затискачі кровоспиняючі типу Москіт; 9 – голка хірургічна зігнута (ЗА 1), 3 / 8 кола; 10 – поліамідні нитки для зашивання рани (Nurlon 2/0, “Ethicon INC”, США); 11 – стерильні нейлонові лігатури (відріз, $L=5$ см, нейлонової нитки типу “А” $d=0,152$ мм (“Gudebrod Nylon Thread”, США)); 12 – стерильні ватні кульки (зроблені з вати медичної хірургічної стерильної (ТОВ “ВАТФАРМ”, Україна)).

Попередньо здійснювалась передстерилізаційна очистка інструментів шляхом їх поміщення у в 1 % розчин сайдезиму (CIDEZIME, “Johnson & Johnson”, США). Опісля, інструменти промивали впродовж 0,5 - 1 хв новим, чистим розчином сайдезиму відповідних концентрацій. Далі, інструменти разом із скляним посудом розміщувалися в електричній сушильній шафі 2в-151 і стерилізували сухим жаром при $t = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 45 хв. Простерилізовані і підготовлені до роботи інструменти зберігались у спеціальній стерильній тарі в шафі.

Хірургічні маніпуляції з твариною здійснювались після досягнення нею глибокого наркотичного сну. Спершу щура зважували на електронних вагах AXIS AD - 50 (Польща), після чого, розміщували на операційному столі з термальною подушкою в положенні на спині, для проведення хірургічних маніпуляцій на обох задніх кінцівках (м'язи контрлатеральної кінцівки використовувалась в інших дослідженнях). Передні і задні кінцівки тварини фіксували еластичними пов'язками, прикріпленими до ротаційних важелів операційного стола. Температура тіла щура підтримувався на рівні $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для цього регулювалась температура термальної подушки.

Для забезпечення доступу до судинно-нервового пучка шерсть на кінцівці в *reg. femoris* вистригали ножицями Н - 18. Після цього, поверхню шкіри дезинфікували 5% - спиртовим розчином йоду (“Віола”, Україна). Для дерматомії (довжина розрізу – 2,5 см) використовувались пінцет ПМ - 8 і ножиці Н - 19, після цього, краї рани фіксувались затискачами кровоспиняючими. Далі, ножицями Н - 19 розрізалась мембрана стегнової оболонки (для її утримання використовувався пінцет ПМ - 11).

З метою запобігання висушуванню тканин, розріз періодично зволожувався приготованим стерильним 0,9% ізотонічним фізіологічним розчином NaCl_2 ($t = 37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Коли судинно-нервовий пучок був експонований,

ножицями Н - 19 здійснювався розріз оточуючої його сполучної тканини (для її утримання використовувався пінцет ПМ - 42 - 1) в проксимальному й дистальному кінцях.



Рисунок 2.5. Процес проведення хірургічного втручання

Перед початком препарування *musculus soleus* попередньо оцінювалась глибина наркотичного сну в тварини вище описаним методом. При потребі, застосовувалась підтримуюча доза наркозу. Для забезпечення доступу до м'яза, шов утримувався пінцетом ПМ - 8 і розрізався ножицями Н - 18, після чого, нитки і дренажну трубку виймали з нього, а рану протирали сухими стерильними ватними кульками. По цьому її розширювали, утримуючи вільні краї пінцетом ПМ - 8 і розрізаючи ножицями Н - 19 у проксимо-дистальному напрямку. В ділянці *articulatio talocruralis* виконувався циркулярний розріз шкіри, після чого, її відтягували з гомілки пінцетом ПМ - 8 в проксимальному напрямку.

Для доступу до *musculus soleus* ножицями Н - 19 розрізалась навколom'язова фасція. Розріз виконувався латеральніше судинно-нервового

пучка. Після цього, вирізались поверхневі м'язи: *m. biceps femoris* та *m. semitendinosus*, а глибокі м'язи згиначі, малогомілкові м'язи і м'язи передньої поверхні гомілки залишалися недоторканими. Для очищення від залишків фасціальної сполучної тканини (маніпуляція здійснювалась під стереомікроскопом Brunel IMX Zoom Trinocular зі збільшенням 10х. Використовувались пінцети ПМ – 42 - 1 і ножиці Н - 19), м'язовий препарат промивали 0,9% ізотонічним розчином NaCl_2 ($t = 37 \pm 1^\circ\text{C}$) і розміщували в чашці Петрі з таким же розчином (розчин з чашкою Петрі були попередньо нагріті до $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

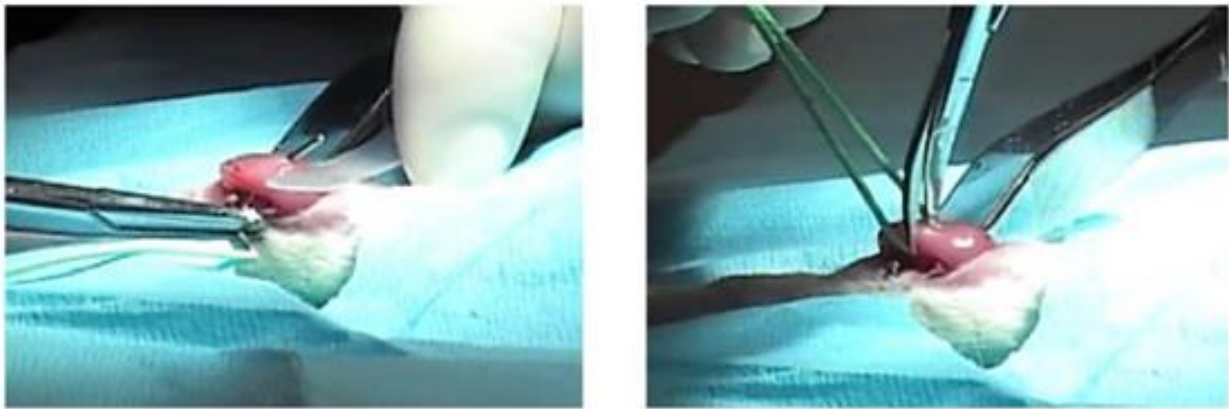


Рисунок 2.6. Препарування м'яза.

Проксимальний сухожильний кінець м'яза фіксували механічним затискачем лінійного серводвигуна, а дистальний – системи серводвигуна навантаження з інтегрованим датчиком сили. Після фіксації м'яза у камері ТУ, задавали початкову рівноважну довжину (L_0 – довжина, за якої напруження ізолюваного м'яза відсутня) м'яза для подальшої реєстрації кількісних характеристик його силової відповіді. Для підготовки до модульованої стимуляції еферентів у відповідних сегментах перерізували вентральні корінці

безпосередньо у місцях їхнього виходу зі спинного мозку. Філаменти перерізаних вентральних корінців закріплювали на стимулюючих електродах і здійснювали циклічний розподіл послідовності стимулів. Стимуляцію корінців здійснювали пулами 2 мс електричних імпульсів, які генерувалися за допомогою генератора імпульсів. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювався за допомогою механостимуляторів.

Після закінчення гострого експерименту, тварини (знаходились в стані глибокого наркотичного сну) були піддані активній евтаназії.

2.5. Устаткування для експериментів на м'язовому препараті.

Устаткування було розроблене і створене на кафедрі біофізики Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Воно складалось із інтегрованої системи обладнання, компонентами якої є власне ТУ (з автономною оптичною системою (ОС)) для експериментів на ізольованому м'язовому препараті, яка розміщена у металевій заземленій ванні з демпферами вібрації і додаткове периферичне обладнання: електростимулятор, сервопідсилювач, термостатичний пристрій (ТП), перфузійна система (ПС) (рис. 2.7) і персональний комп'ютер (ПК).

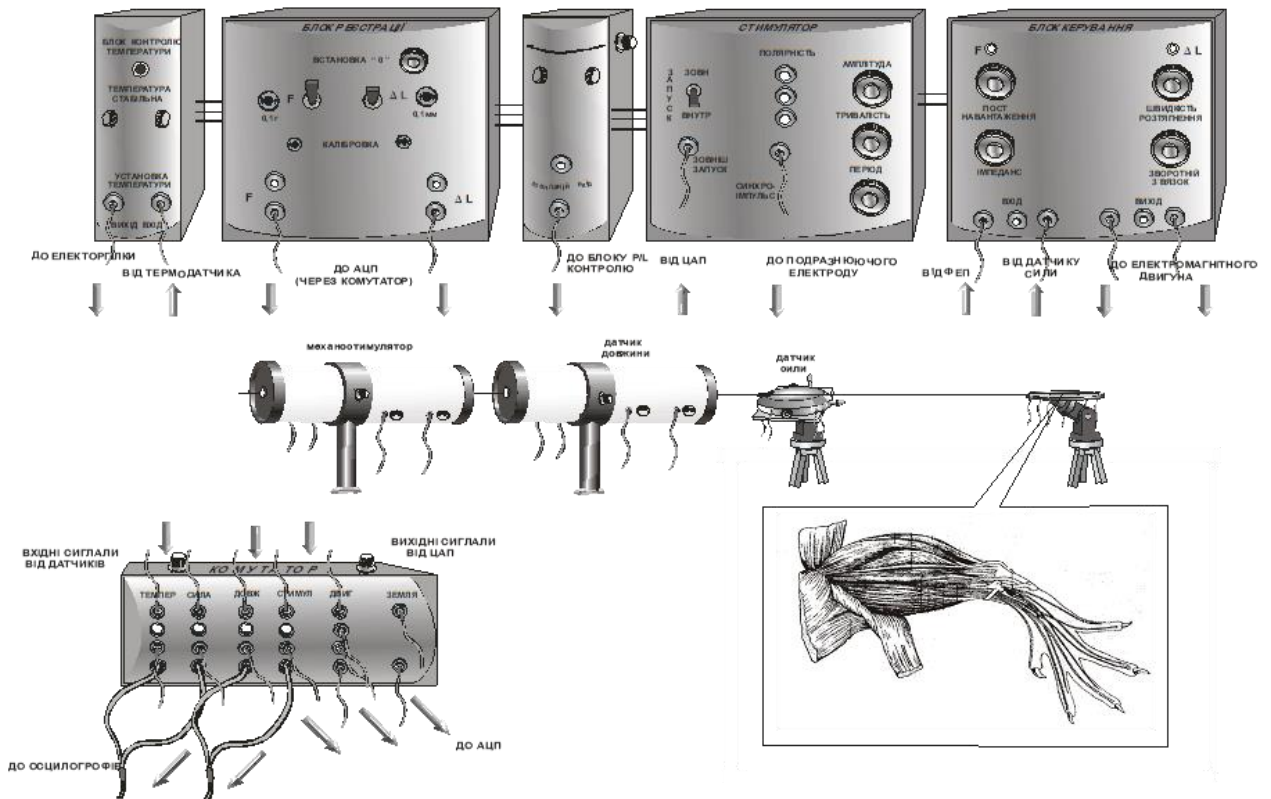


Рисунок 2.7. Загальний схема тензометричної установки.

Для реєстрації електрофізіологічних сигналів скорочення м'яза використовували 12-ти розрядний аналого-цифровий та цифро-аналоговий перетворювач (АЦП-ЦАП). Вихідні імпульси ЦАП запускали ізольовані стимулятори (DS2A, Digitimer), які здійснювали стимуляцію нервів. Вхідні сигнали через підсилювач подавали на АЦП і реєстрували з частотою опитування 10 кГц. Лінійний двигун у положенні сервокерування використовували для розтягування м'яза та вимірювання зусилля, яке той розвивав. Зусилля вимірювали за допомогою напівпровідникових тензодатчиків, наклеєних на жорсткі сталеві балки, встановлені на рухомі частини лінійного двигуна. Жорсткість знімача перевищувала 0.06 Н/мм, стала часу перехідних процесів довжини не перевищувала 60 мс.



Рисунок 2.8. Реєстратор сили м'язового скорочення (датчик сили).

Ізометричне навантаження на м'язовий препарат здійснювалось лінійним серводвигуном навантаження з інтегрованим датчиком (рис. 2.8). Серводвигун рухомо фіксувався на блоці ТУ навпроти датчика довжини. Крок зміщення електромагнітного двигуна становив 1 В / мм.

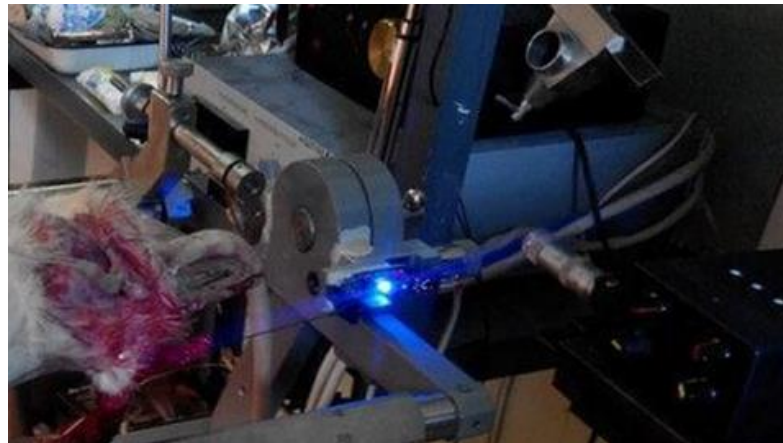


Рисунок 2.9. Тензодатчики у процесі реєстрації тетанічного скорочення.

Інтегрований датчик сили виготовлений з промислового напівпровідникового чутливого елемента тензодатчика із напиленою на лейко-

сапфірову підкладку кремнієвою мостовою схемою (С - 03). Чутливість датчика сили становила 1г/10 В (рис.2.9).

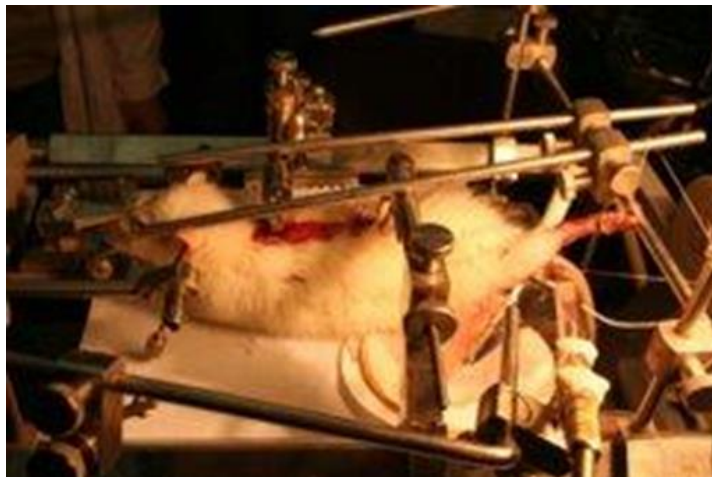


Рисунок 2.10. Загальний вигляд під'єднаної до установки експериментальної тварини.

Довжину м'яза м'язового препарату для створення ізометричного режиму навантаження і дослідження його реологічних характеристик контролювали лінійним серводвигуном довжини, який розміщений в протилежному, відносно лінійного серводвигуна навантаження з інтегрованим датчиком сили, кінці блока ТУ. Сформований ФЕП сигнал у відповідь на зміщення м'яза трансформувався в цифрову форму й відображався у вигляді осцилограм на моніторі ПК. (рис.2.10). Обидва датчики з'єднані з підсилювачами та комплексом АЦП - ЦАП. Аналоговий сигнал від датчика сили надходив на 2 - канальний аналого-цифровий перетворювач ("Iris USB-Oscilloscope", ТТОВ "Відео-Інтернет Технології" Україна), розрядністю 10 біт із частотою дискретизації 0,01 Гц - 1кГц. Середній час запізнювання відповідних коливань

перетвореного в цифрову форму аналогового сигналу становив ~ 12 мс (рис.2.11).



Рисунок 2.11. Підсилювач тензометричної сервокерованої установки (пояснення в тексті).

Електричні стимуляційні імпульси генерувались 2 - каналним стимулятором. Стимулятор дозволяв рівномірно регулювати тривалість і період стимулюючого сигналу (в обох режимах), який складався з індивідуальних імпульсів із регулярною амплітудою (2 В) та змінною тривалістю ($0,2 - 2$ мс) й частотою ($0,5 - 50$ Гц) (рис.2.12).

Властивості скорочення *musculus soleus* вимірювались в ізометричному режимі, який досягався розтягненням м'яза в камері ТУ впродовж 60 хв до довжини L_0 . Попередньо, L_0 *musculus soleus* була скоригована задля забезпечення його здатності максимально сильно скорочуватись. Для цього, розтягнений *musculus soleus* стимулювали електричним імпульсом наругою 2 В й тривалістю $0,2$ мс. Оптимально скоригованою вважалась L_0 , при якій

амплітуда індивідуального скорочення м'яза становила 0,08 - 0,12 В у відповідь на застосований імпульс. При такій амплітуді реєструвався гладкий тетанус із індексом злиття $0,98 \pm 0,01$.



Рисунок 2.12. Стимулятор тензометричної сервокерованої установки (пояснення в тексті).

Після знаходження оптимальної L_0 *musculus soleus*, він циклічно стимулювався імпульсами прямокутної форми (наруга – 2 В, тривалість – 0,2 мс, частота – 50 Гц), які були сформовані в 12 циклічних стимуляційних паттернів тривалістю 3 с з періодом 5 хв. Осцилограми скорочення *musculus soleus* відображалась на моніторі осцилографа, який з'єднаний з ПК через відповідне програмне забезпечення. Діапазон амплітуди вхідних сигналів: 0 - 2 В і 2 - 20 В. Розмах шкали напруги вхідного сигналу 0,3 - 2 В / Е. Похибка квантування – 0,0039 В. (рис.2.13.)

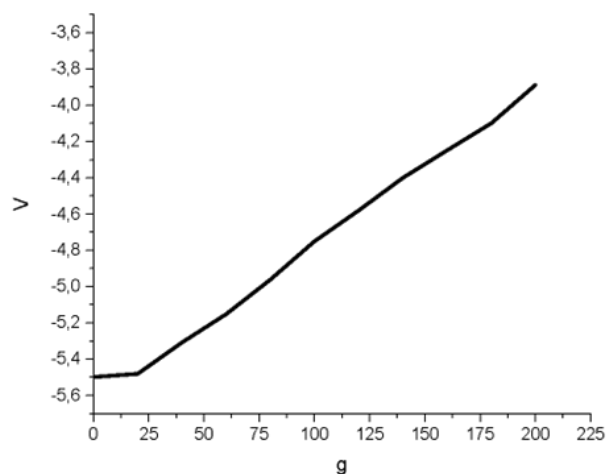


Рисунок 2.13. Графік, на основі якого здійснювалося калібрування тензодатчиків. Примітка: V- напруга, В, g – маса калібрувальних гирьок, г.

2.6. Вимірювані параметри скорочення *musculus soleus*

При аналізі отриманих даних було застосовано низку методик визначення рівнів досліджуваних маркерів як показників фізіологічного стану нервово-м'язової системи досліджуваних об'єктів.

Рухома одиниця - мотонейрон і популяція м'язових волокон, які він іннервує, є одним з найважливіших функціональних елементів системи рухового контролю. Мотонейрони розряджаються безперервно у відповідь на стійку надпорогову активацію збудливих входів складними стимуляційними пулами. Дисфункція роботи цієї системи веде до серйозних порушень

1. *Зміна часу початку силової відповіді м'яза, викликана поодиноким стимуляційним пулом.*

Вираховується за часом між першою і другою мітотичною відповіддю викликаною послідовною стимуляцією з відомим часом між ними 2000мс. Даний показник дає можливість оцінити наявність або відсутність нейро- або міопатії при початкових стадіях дослідження та скоригувати алгоритм

подальшого дослідження за наявності патологічних змін у цих процесах. Часові параметри проведення стимуляційних пулів за аксоном не залишаються постійними як при зміні інтенсивності стимуляції, так і часу релаксації. Дослідження змін часових затримок проведення імпульсів зі збільшенням кількості стимулів дозволяє оцінити рівень патологічних змін у нервово-м'язовому препараті при тривалих, статичних і повільних динамічних реакціях м'язової системи.

Високочастотна стимуляція периферичних аферентів, що утворюють моносинаптичні контакти з мотонейроном, спричиняє ефективну сумачію послідовних потенціалів дії та стійку деполяризацію клітинної мембрани. При цьому частота імпульсації визначається середнім рівнем деполяризації мембрани і підвищується при зростанні частоти стимуляції. При розвитку патологічних процесів, застосування безрелакційної стимуляції відповідної тривалої трансинаптичної активації мотонейронів стає помітним характерне адаптаційне зниження часу проведення стимулу нервової тканини. Зміна цього показника є характерним маркером наявності патологічних процесів у нервово-м'язовому препараті при застосуванні стимуляційних сигналів, близьких до фізіологічних параметрів.

2. Аналіз змін динамічних параметрів нервово-м'язового препарату при застосуванні модульованого за частотою стимуляційного сигналу.

При аналізі міотичної відповіді досліджуваного м'яза при застосуванні модуляційного стимулюючого сигналу нами було проаналізовано кілька основних біомеханічних параметрів. Дані параметри є загальновизнаними маркерами наявності біомеханічних порушень, викликаних факторами різної природи.

Наявність змін у кожному з описаних біомеханічних параметрів є показовим маркером наявності дисфункцій певної ланки в ланцюзі збудження-

відповідь як нервово-м'язового препарату, так і стану організму в цілому. Для більш зручного опису змін отриманих кривих ми позначили досліджувані відрізки біомеханічних відповідей (рис. 2.14).

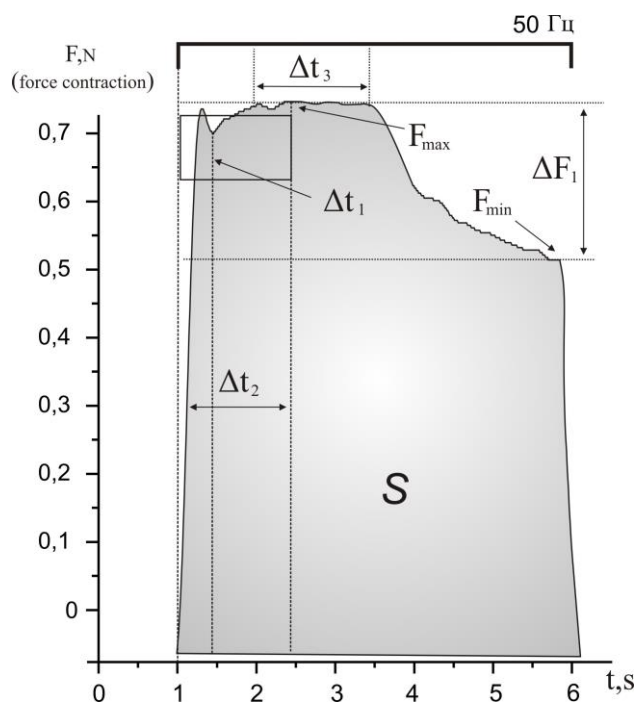


Рисунок 2.14. (пояснення в тексті)

3. Зміна часу досягнення максимальної силової відповіді.

Максимальна генерація сили, на яку здатний активний м'яз є важливим показником для швидких, балістичних не цілеспрямованих рухів (рис 2.14.- F_{max} .) Рівень зміни даного показника показує рівень фізіологічної дисфункції нервово-м'язового препарату при реалізації ним максимальних силових завдань.

4. *Зміна часу досягнення стаціонарного стану скорочення при застосуванні модульованого стимуляційного сигналу.*

Стаціонарний стан активного м'яза є часовою ділянкою силової скорочувальної активності м'язової тканини без наявності суттєвого тренду в ту

чи іншу сторону, під час активації м'яза (рис 2.14.- Δt_3). Фізіологічно - стаціонарний стан активного м'яза - це той рівень силової продукції м'яза, який відповідає фізіологічному стану нервово-м'язового препарату на даний момент часу. Час його встановлення – є маркером часу проходження адаптаційних процесів у м'язі під час її активації стимуляційними пулами, для вибору оптимальних амплітудно-силових характеристик м'яза, що скорочується, з метою реалізації стимуляцій з найбільш меншими відхиленнями від запрограмованих ЦНС завдань.

5. Зміна рівня максимальної сили скорочення.

Даний маркер є показником загальної дисфункції м'язової системи. Зміна даного параметра може бути пов'язана як з порушенням у нейронному компоненті, так і міотичними складовими досліджуваної патології. Описана дисфункція даного параметра, також може бути пов'язана з порушенням цілісності сигналів, які генерують синаптичний струм мотонейрона, і як наслідок порушення сумації трансмембранних струмів відповідно до внутрішніх мембранних. Що і впливає на патологічне перетворення послідовності потенціалів дії, які запускають м'язове скорочення, що викликає максимальну силову відповідь.

6. Зміна рівня генерації мінімальної сили скорочення.

Цей маркер є показником максимальних патологічних змін, викликаних патологічним процесом під час аналізу змін динамічних параметрів скорочення у кожному послідовному скорочувальному акті (рис 2.14.- F_{\min}). При виконанні досить простих односуглобових рухів даний маркер є основним показником м'язової дисфункції, феноменологічний аналіз якого дає можливість встановити наявність причинно-наслідкових зв'язків між рівнем зниження біомеханічної активності м'язів, основними механічними параметрами рухів і рівнем розвитку

патологічного процесу. Точність такого аналізу підвищується при багаторазовому повторенні даних стимуляцій та збільшення часу стимуляції.

7. Зміна різниці між максимальною та мінімальною силовою відповіддю активного м'яза.

Даний маркер є показником м'язових дисфункцій, що відбуваються під час реалізації кожної низхідної стимуляції. Аналіз цих змін показує наявність або відсутність патологічних змін, що впливають на розвиток м'язової відповіді в рамках кожного окремого скорочувального акту. У природних умовах центральне регулювання сили скорочення скелетних м'язів може забезпечуватися шляхом зміни частоти імпульсації мотонейронів або їх активації або деактивації. За наявності різниці між максимальною та мінімальною силовою відповіддю активного м'яза, при стимуляційному сигналі постійної частоти, створюються серйозні труднощі корекції контролю м'язової сили з боку ЦНС. Його зміна (збільшення) є фактором (зменшення) стійкості м'яза як динамічної системи в умовах її безперервної активації.

8. Зміна імпульсу м'язової сили (інтегрованої потужності м'язового скорочення).

Інтегрована потужність, яка розрахована за загальною площею силових кривих (рис 2.14.- S.) є показником загальної працездатності м'яза при застосованих стимуляційних пулах. Аналіз цього параметра дозволяє оцінити механізми формування м'язової активності у системі рівноваги у системі сила – зовнішнє навантаження, що є фізіологічним аналогом працездатності м'язової системи загалом.

9. Зміна процесів втомлювального нервово-м'язового препарату при розвитку досліджуваних патологій.

У роботі проведено аналіз розвитку втомлювальних процесів при розвитку досліджуваної патології при застосуванні безрелаксаційної стимуляції,

що дозволило оцінювати розвиток втоми в різних часових діапазонах. Оцінка розвитку втоми проводили методом розрахунків часових інтервалів при досягненні 25 і 50% рівнів силових відповідей, при стимуляційних подразненнях. Слід зазначити, що у контрольних значеннях зміни цього показника малотривалі часові рамки, що ускладнювало адекватне опис втомних процесів у розвитку патології. Тому для більш інформативного опису отриманих результатів зміна силової відповіді в контрольних значеннях приймалася за 100%, і при аналізі даних описувалася різниця відсоткових показників.

10. Аналіз індексу злиття

Аналізуючи динаміку реальних рухів, ми враховували особливості перетворення сегментарної та низхідної активності у процесі розвитку патології. Важлива роль реалізації рухової функції належить асиметричному характеру реакцій м'язи підвищення рівня надходить еферентної активності. Всі досліджувані в нашій роботі рухи - відносно прості, що базуються на рефлексорних компонентах, зрештою забезпечуються конкретним патерном активації великої кількості мотонейронних популяцій.

Оскільки мотонейрони безпосередньо керують м'язовим скороченням, характер перетворення активності, що до них з численних джерел, багато в чому і визначається особливостями м'язової динаміки. Значна інерційність м'язового скорочення у разі розвитку патологічного процесу вимагає від мотонейронів наявності таких динамічних властивостей, які могли б компенсувати недостатньо високі швидкісні параметри скорочення м'яза. Таким чином, уповільнення виникнення гладких скорочувальних реакцій (гладкого тетанусу) може бути ще одним із параметрів, що описують динаміку розвитку патологій у нервово-м'язовому препараті. У роботі проведено аналіз переходу силової відповіді активного м'яза зі стану зубчастого тетанусу в гладкий. Аналізували зміну часу між піками силової відповіді та їх максимальну силу. Два описані

параметри є критичними факторами для адекватного переходу активного м'яза зі стану зубчастого тетанусу в гладкий. Аналіз їх змін дає уявлення про особливості дисфункції при генеруванні сили окремими руховими одиницями та послідовний характер їх активації забезпечують можливість плавного регулювання сили, що розвивається цілим м'язом.

2.7. Методика використання світлової мікроскопії у дослідженнях.

Для гістологічного дослідження були відібрані м'язи з п'яти аналогічних тестових груп, які не піддавалися стимуляції. Зразки м'язів фіксували в 10% формаліні при кімнатній температурі протягом 14 днів, а потім у 7% формаліні ще протягом 10 днів. Зразки промивали під проточною водою протягом 24 годин для видалення фіксатора. Потім матеріал зневоднювали. Спирти використовували у зростаючих концентраціях: 60% протягом 6 годин, 70% протягом 6 годин, 80% протягом 6 годин, 90% протягом 4 годин і 100% протягом 2 годин. Як правило, матеріал залишали в спирті щонайменше на 24 години, оскільки повне зневоднення є найважливішою передумовою для успішної інфузії.

Після зневоднення досліджуваний матеріал зберігали в суміші 100% спирту і ксилолу (1:1) протягом 30 хвилин. Потім його переносили в ортоксилол на 20 хвилин і поміщали в насичений розчин парафіну в ортоксилолі при 37°C на 30 хвилин. Потім зразки м'язів утримували в чистому парафіні в термостаті при 56°C протягом 12 годин. Для виготовлення зрізів матеріал заливали в паперові форми, охолоджували у воді, розрізали на блоки і наклеювали на дерев'яний кубик з розплавленим парафіном [102].

Блоки різали в горизонтальній площині на санному мікротомі (МС-2) товщиною 10-15 мкм під кутом 15°. Для кращої адгезії парафінових зрізів предметні скельця покривали сумішшю яєчного білка і гліцерину, потім

нагрівали над полум'ям спиртового пальника і поміщали в термостат при 37°C на 24 години. Парафін із зрізів видаляли ксилолом. Для цього зрізи поміщали в ксилол на 3 хвилини для розчинення парафіну. Після розчинення парафіну зразки поміщали в 100% спирт на 2 хвилини, потім в 90%, 80% і 70% спирт на 2 хвилини і, нарешті, в дистильовану воду.

Зрізи забарвлювали за методом Ван Гізон з використанням гематоксиліну Харріса та розчину пікрофуксину і заливали в полістирол. Ця методика дозволяє виявити колагенові елементи в сполучній тканині, які забарвлюються в червоний колір і виділяються на тлі інших тканинних елементів, які забарвлюються в жовтий і жовто-сірий кольори.

Гістологічні препарати фотографували за допомогою цифрової камери SEO мікроскопу Axioskop – 40 (Carl Zeiss). Обробку цифрових фотографій форматів JPEG проводили у програмі Adobe Photoshop 8.0. Морфометричні показники (товщина м'язового волокна та величина міжфібрилярного простору) вимірювали за допомогою програми «ВідеоТест Морфологія 5.0».

2.8. Методика приготування та характеристики водного колоїдного розчину C₆₀ фулеренів

Для отримання C₆₀ФВР був застосований метод, який ґрунтується на переведенні молекул C₆₀ фулерену з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком [134]. Для цього змішували насичений розчин чистого C₆₀ фулерену в толуолі ступеня чистоти вище 99,5%, з максимальною розчинністю ~ 2,9 мг/мл, та еквівалентний об'єм дистильованої води у склянці [135].

Дві водні фази, що утворилися, обробляли ультразвуком. Процедуру продовжували до повного випаровування толуолу і зміни кольору водної фази на жовтий (Рис. 2.15).

Фільтрування водного розчину відокремлює бажаний продукт від нерозчинного фулерену C_{60} . Цей метод можна використовувати для отримання різних концентрацій у воді - від 0,01 до 1,2 мг/мл. Потім вимірюють спектри поглинання фулерену C_{60} у воді в діапазоні довжин хвиль $\lambda = 200-700$ нм при кімнатній температурі.



Рисунок 2.15. Водний колоїдний розчин C_{60} фулеренів у концентрації 0,15 мг/мл.

Як виявляється, в УФ-ділянці спектра домінують дві інтенсивні широкі смуги поглинання з максимумами при 265 і 345 нм. Одержаний водний колоїдний розчин цієї сполуки за максимальної концентрації 0,15 мг/мл є стабільним упродовж 12 місяців за температури $+4$ $^{\circ}C$.

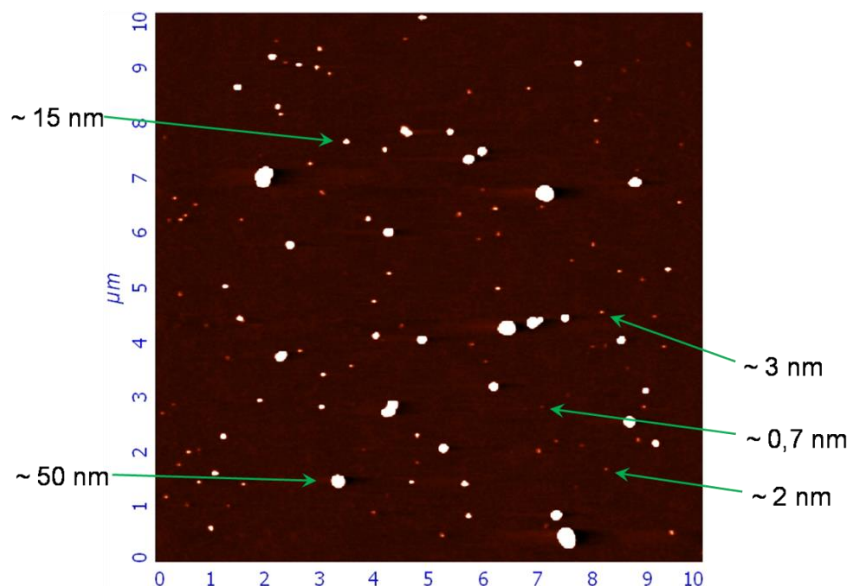


Рисунок 2.16. АСМ – зображення структурованого стану C₆₀ фулерену у воді за концентрації 0,15 мг/мл. Матеріал підкладки: слюда.

За допомогою атомно-силової мікроскопії було показано, що такі водні розчини C₆₀ фулеренів є полідисперсними системами, які містять як поодинокі молекули діаметром 0,7 нм, так і об’ємні агрегати – 2 – 50 нм (рис. 2.16).

Досліджувані щури (експериментальні групи «алкоголізація +С60») до початку алкоголізації (n = 10) та в процесі алкоголізації (дві групи по n = 10 тварин у кожній) вживали С60 ВРФ дозою у 1 мг/кг ваги тварини. Ця доза як найбільш ефективна була обрана на основі раніше проведених досліджень [26–29]. Контроль кількості вживаного С60 ВРФ здійснювали шляхом відмови у доступі тварин до 100%-питної води до повного використання ними застосованого препарату. Використовували три схеми введення С60ВРФ: за 1 годину до прийому алкоголю («профілактична схема»), разом з алкоголем («терапевтична схема I») і через 1 год після прийому алкоголю («терапевтична схема II»). Обрана концентрація підбиралась на експериментально-

встановлених результатах дослідників, які показали високий ступінь протипухлинної дії та гепатопротекцію C₆₀ ФВР при кумулятивній дозі 5-7,5 мг на кілограм маси тварини. Варто зазначити, що використана доза C₆₀ фулерену у наших експериментах була значно нижчою за значення LD₅₀, яка за перорального введення щура становила 600 мг/кг ваги тіла [136].

2.9. Біохімічний аналіз.

Рівень вмісту ферментів у плазмі піддослідних тварин (креатиніну, креатинфосфокінази, лактату, лактатдегідрогенази) та оцінки рівня окисних процесів у тканинах (вміст пероксиду водню, відновленого глутатіону, активність каталази, активність селен-залежної глутатіонпероксидази (GPx) та активність супероксиддисмутази (SOD) - як маркерів окисного пошкодження м'язів, визначали за допомогою клініко-діагностичного обладнання – гемоаналізаторів RNL -200, JN-1101- TR2. Концентрацію алкоголю в крові проводили наприкінці дослідження шляхом пункції серця та визначали з використанням аналізатора алкоголю AM1 (Analox Instruments Lt).

2.10. Статистичний аналіз даних.

Статистичний аналіз отриманих експериментальних цифрових даних здійснювався з використанням методів варіаційної статистики у програмі Statistica 10.0. ("Statsoft Inc.", США). Перевірку вибірок на їхню приналежність до нормально розподілу генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Вілка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t - критерій Стюдента. Вірогідними вважалися відмінності при $p \leq 0,05$. При побудові графіків враховували відносну та абсолютну похибки експерименту, які обраховувались за формулами:

Абсолютна похибка:

$$\Delta = \Delta_g + \Delta_c \quad (1),$$

де Δ_g та Δ_c - випадкове та систематичне відхилення, відповідно.

Перше пов'язано з суб'єктом, друге – з точністю показників приладу.

При визначенні випадкового відхилення користувались наступною формулою:

$$\Delta_B = t \sqrt{\frac{\delta_1^2 + \delta_2^2 + \dots + \delta_n^2}{n(n-1)}} \quad (2),$$

де δ – поодинокі випадкові відхилення, n -кількість вимірювань, t – коефіцієнт Стюдента. Остання величина – таблична і залежить від кількості вимірювань n та ступеню достовірності P . Величина P в експериментах приймалась за 0,95.

Відносну похибку розраховували за наступною формулою:

$$\varepsilon = \frac{\Delta}{\langle x \rangle} \quad (3)$$

де $\langle x \rangle$ - середнє квадратичне усіх аналогічних вимірювань.

Усі числові результати представлялися у вигляді середнього арифметичного \pm похибки середнього ($M \pm m$). Кожна з кривих, наведених на рисунках в даній роботі, є результатом узагальнення 10-ти аналогічних експериментів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Використання механокінетичних маркерів для аналізу впливу водного розчину C_{60} фулерену на динаміку м'язового скорочення хронічно-алкоголізованих щурів

Високочастотне подразнення периферичних аферентів, які формують моносинаптичні контакти з мотонейроном, забезпечує ефективне підсумовування потенціалів дії, подальшу стійку деполяризацію клітинної мембрани. При цьому частота імпульсації визначається рівнем деполяризації клітинної мембрани і підвищується із зростанням частоти подразнення.

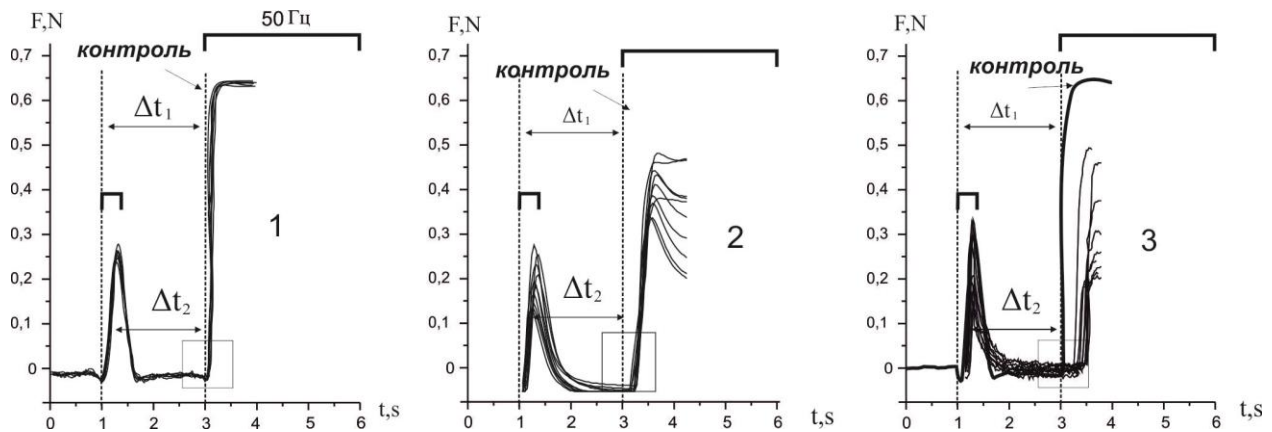


Рисунок 3.1. Зміна часу початку силової відповіді м'яза у щурів з алкогольною міопатією, викликане 10-ти послідовними пулами електростимуляції частотою 50 Гц: контроль – механограма контрольних щурів; 1, 2, 3 – механограми за 3, 6 і 9 місячної алкоголізації тварин; Δt_1 - час між двома послідовними пулами стимуляції; Δt_2 - час початку м'язової відповіді на застосовану стимуляцію.

За розвитку патологічних порушень, пов'язаних з алкогольною міопатією, та застосування безрелаксаційної подразнюючої стимуляції заданої тривалості має місце адаптаційне зменшення часу проведення стимуляційних імпульсів (рис. 3.1). Зміну даного показника можна вважати характерним маркерним показником наявності патологічних процесів у нервово-м'язовій системі при застосуванні стимуляційних подразнень близьких до фізіологічних параметрів (рис.3.2). Розрахунок зміни часу початку силової відповіді піддослідного *musculus soleus*, ініційованих стимуляційними пулами частотою 50 Гц, у щурів з алкогольною міопатією показав суттєву затримку часу початку силової відповіді зі зростанням тривалості алкоголізації тварин.

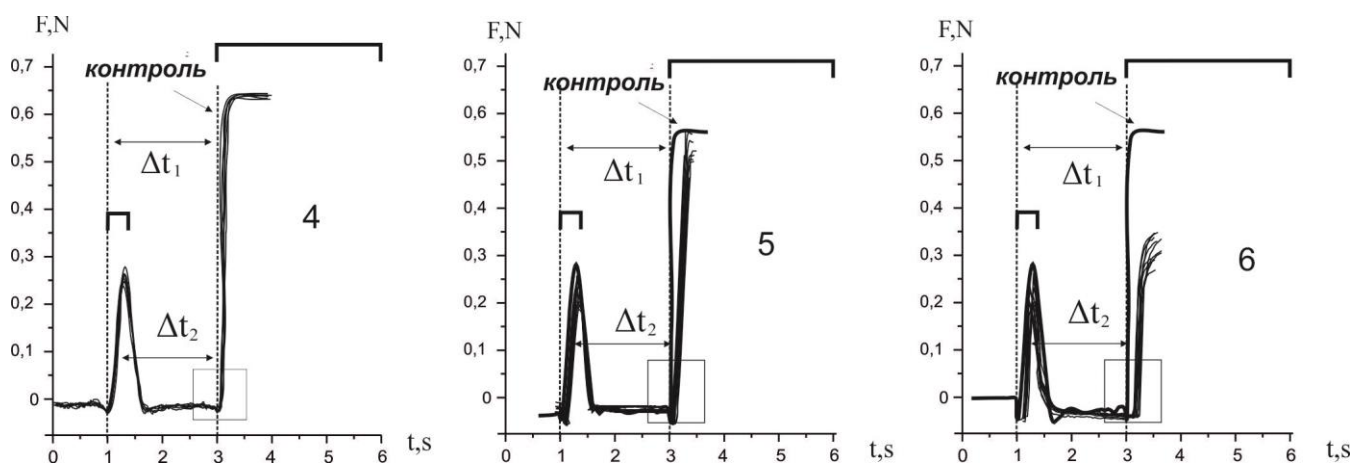


Рисунок 3.2. Зміна часу початку силової відповіді м'яза у щурів з алкогольною міопатією за терапевтичного введення водного розчину C_{60} фулерену, викликане 10-ти послідовними пулами електростимуляції частотою 50 Гц: контроль – механограма контрольних щурів; 4, 5, 6 - механограми за 3, 6 та 9 місячної алкоголізації тварин за терапевтичного введення водного розчину C_{60} фулерену; Δt_1 - час між двома послідовними пулами стимуляції; Δt_2 - час початку м'язової відповіді на застосовану стимуляцію.

При застосуванні 10-ти послідовних стимуляційних пулів виявлено незначне збільшення часу початку силових відповідей м'яза за тривалості алкоголізації тварин упродовж 3 місяців від $107\pm 1\%$ при першому пробігу до $111\pm 2\%$ при десятому пробігу, відповідно (рис. 3.3 а).

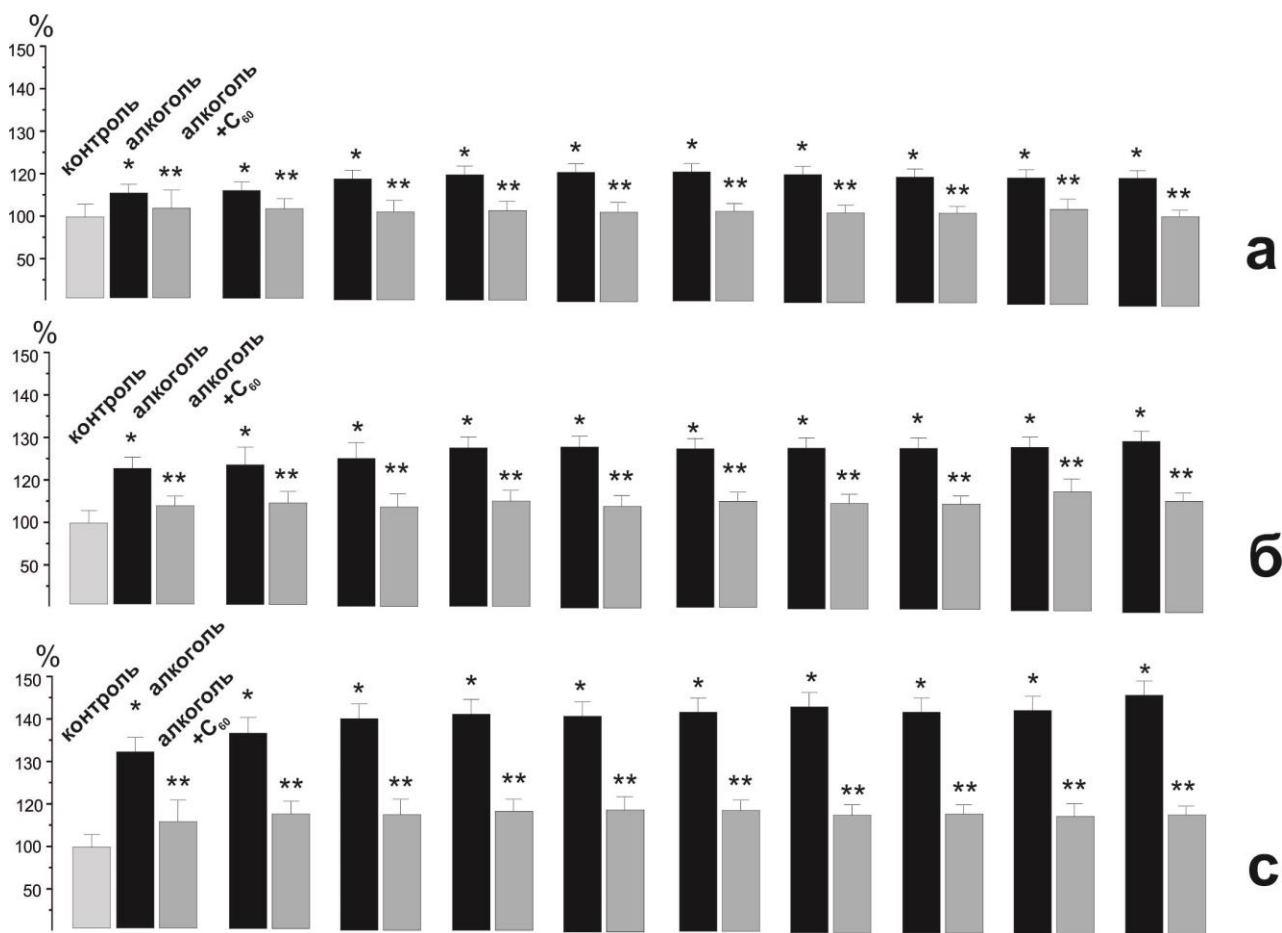


Рис. 3.3. Зміна часу початку 10-ти послідовних безрелаксаційних силових відповідей м'яза щурів з алкогольною міопатією тривалістю 3(а), 6(б) та 9(в) місяців, викликаних послідовними пулами електростимуляції частотою 50 Гц. Дані представлені у відсотках від контрольних значень, прийнятих за 100%; контроль - контрольні значення; * $p < 0,05$ щодо групи контроль; ** $p < 0,05$ щодо групи алкоголь.

Слід зазначити, що зі збільшенням кількості скорочень цей параметр зростав лише на 3%. Зі збільшенням тривалості алкоголізації до 6 та 9 місяців цей показник збільшився до $115 \pm 1\%$ (перший пробіг) і $121 \pm 1\%$ та $142 \pm 1\%$ і $167 \pm 1\%$, відповідно.

З представлених даних видно, що час початку скорочення алкоголізованого м'яза лінійно зростав зі збільшення кількості скорочень. Можна зробити висновок про наявність нейропатичних і міотичних змін, пов'язаних з неможливістю реалізації генерації послідовних 10-ти стимуляційних імпульсів без істотних фізіологічних порушень міопатичного походження.

Отримані дані свідчать, що викликана міопатія веде до значних дисфункцій при передачі стимуляційного сигналу на ефектор [137]. З наближенням параметрів стимуляції сигналу до фізіологічного рівня дисфункції нейро-м'язової активності зростають до рівня, здатного порушити загальну динаміку скорочувального процесу. Швидкі процеси збудження скорочувального апарату за тривалої активації м'язових волокон при виникненні міопатичних пошкоджень, зазвичай, зазнають повільних та стійких змін, які частково можуть бути пов'язані із фосфорилуванням легких ланцюгів міозину, розташованих у шийці містка. Більш повільний процес дефосфорилування при тривалій безперервній активації м'язового волокна викликає стійке фосфорилування міозину, що сприяє підвищенню ступеня рухливості поперечних містків або міняє їхню конформацію [138]. Ці процеси вкрай швидкі за нормальних умов – відбуваються майже миттєво. За міопатичних порушень мембранного комплексу вільними радикалами виникає компенсаторна затримка збудження-скорочення міоцитів, рівень якої пов'язаний саме з внутрішньоклітинними патологічними змінами [139].

Таким чином, використання такого маркера як зміна часу початку силової відповіді м'яза дозволяє встановити тяжкість перебігу алкоголізації піддослідних тварин та рівень міотичних пошкоджень нервово-м'язового препарату.

Аналіз амплітудно-швидкісних змін силової відповіді активного м'яза дає можливість оцінити ефективність впливу терапевтичних препаратів на ці процеси (рис. 3.3). За введення водного розчину C_{60} фулерену і тривалості алкоголізації тварин упродовж 3 місяців час затримки силової відповіді м'яза збільшився на $4 \pm 1\%$ (рис. 3.2, 3.2). Слід зазначити, що зі збільшенням кількості скорочень цей параметр не змінювався взагалі. Зі зростанням тривалості алкоголізації до 4 і 6 місяців цей показник збільшився до $107 \pm 1\%$ та $111 \pm 1\%$, відповідно. У цих випадках упродовж усіх 10-ти безрелаксаційних скорочень час затримки силової відповіді м'яза змінився лише на 2-3%.

Внаслідок розвитку описаних дисфункцій нервово-м'язового комплексу виникає необхідність генерування мотонейронами досить потужних динамічних стимуляційних розрядів для відновлення безпомилкової роботи м'язової системи. Таким чином, за одних і тих рівнів стаціонарної фази еферентної команди збільшення тривалості попередньої динамічної компоненти не лише сповільнює виникнення силової відповіді м'яза, але й веде до зменшення максимальної силової генерації [140]. Ці процеси відіграють ключову роль у позиціонуючих рухах кисті і пальців рук. Описані порушення у системі контролю цих процесів здатні викликати серйозні фізіологічні проблеми.

Незважаючи на наявність абсолютно нових експериментальних підходів на мікрорівні до аналізу нервово-м'язової регуляції, класичні електрофізіологічні експериментальні методи вивчення нервово-м'язового препарату займають провідне місце [141]. Такі дослідження необхідно проводити не тільки для більш точного кількісного аналізу патологій м'язового

скорочення, але й для детального вивчення центральних процесів, що беруть участь у регуляції м'язової функції.

Проведений аналіз динамічних характеристик різних ланок рухової системи дає уявлення про зміни у динаміці складних рухів, пов'язаних з точностним позиціонуванням суглобів, та її здатності проводити корекцію низхідних рухових команд з адаптаційними процесами у центральних нейронах. Для адекватного розуміння та аналізу цих змін необхідний комплексний експериментальний підхід з можливістю одночасного контролю різних біомеханічних параметрів з різними амплітудно-часовими інтервалами і лабільною системою зовнішнього подразнення. Тільки в цьому випадку можна спостерігати зміни в реакції нервово-м'язових препаратів на стимуляцію під час розвитку балістично точних позиційних рухів, аналіз яких буде важливим для розуміння рівня міопатичних патологій. Отже, з огляду на отримані результати, можна зробити висновок, що використаний метод визначення рівня алкогольної міопатії показав, що вона призводить до значних морфологічних і функціональних змін м'язових волокон. Причиною цього, на нашу думку, є виснаження енергетичних речовин клітини і зміна концентрації кальцію в міоплазмі, що призводить до швидкого порушення гомеостазу і втрати іонного градієнта клітинними мембранами і, як наслідок, до відстрочення настання силової відповіді м'яза. Патологічні зміни опосередковуються дією вільних радикалів кисню, які пошкоджують клітинні компоненти, зокрема сарколеми та мітохондрій, на фоні пригнічення антиоксидантних систем організму. Виражений протекторний вплив C₆₀ФВР на морфологічні та силові зміни м'язів алкоголізованих щурів можна пояснити мембранотропними та потужними антиоксидантними властивостями молекули C₆₀ фулерену. Отримані дані можуть бути корисними при дослідженні погіршення скоротливої функції м'язів, а також розробці ефективних методів терапії при порушеннях роботи

опорно-рухового апарату, пов'язаних з міотичними ушкодженнями на фоні алкогольної інтоксикації організму.

Таким чином використання стимуляційного маркера - зміна часу початку силової відповіді м'яза - дає змогу неінвазивним методом визначати рівень міотичних ушкоджень хронічно алкоголізованих щурів. Аналіз отриманих за цим методом механограм дає можливість оцінювати терапевтичний вплив C₆₀ фулерену на процеси м'язового скорочення при розвитку алкогольної міопатії різних ступенів важкості. Отримані за цим методом данні, показують наявність виражених захисних властивостей C₆₀ фулерену при терапії алкогольної міопатії.

3.2. Аналіз змін флуктуаційних коливань м'язової сили при терапії водорозчинним фуллереном C₆₀ хронічно алкоголізованих щурів.

На рисунку 3.4 представлені механограми скорочення *musculus soleus* алкоголізованого протягом 6 місяців щура.

На фазі утримання максимальної силової відповіді на протязі усього часу стимуляції спостерігаються яскраво виражені флуктуаційні коливання. Рівень цих коливань прогресивно збільшувався з кожним наступним скоротливим процесом (рис.3.4 с) і складав 0,68-0,73N ±2% на першому і п'ятому пробігу безрелаксаційного скорочення відповідно.

Слід відмітити, що флуктуаційні коливання тривали протягом усього періоду подразнення м'яза. Аналіз механограм алкоголізованих щурів після п'ятиденного введення фулерену C₆₀ показав значну фіксацію силової відповіді на фазі утримання максимальних силових значень скорочення (рис.3.4 б). Рівень флуктуаційних коливань на фазі досягнення максимальних силових значень значно знизився і склав 0,51-0,53N ±2% на першому і п'ятому пробігу

безрелаксаційного скорочення відповідно. Слід відмітити, що зі збільшенням кількості безрелаксаційних скорочень рівень флуктуацій силових відповідей практично не змінювався (рис.3.4 с).

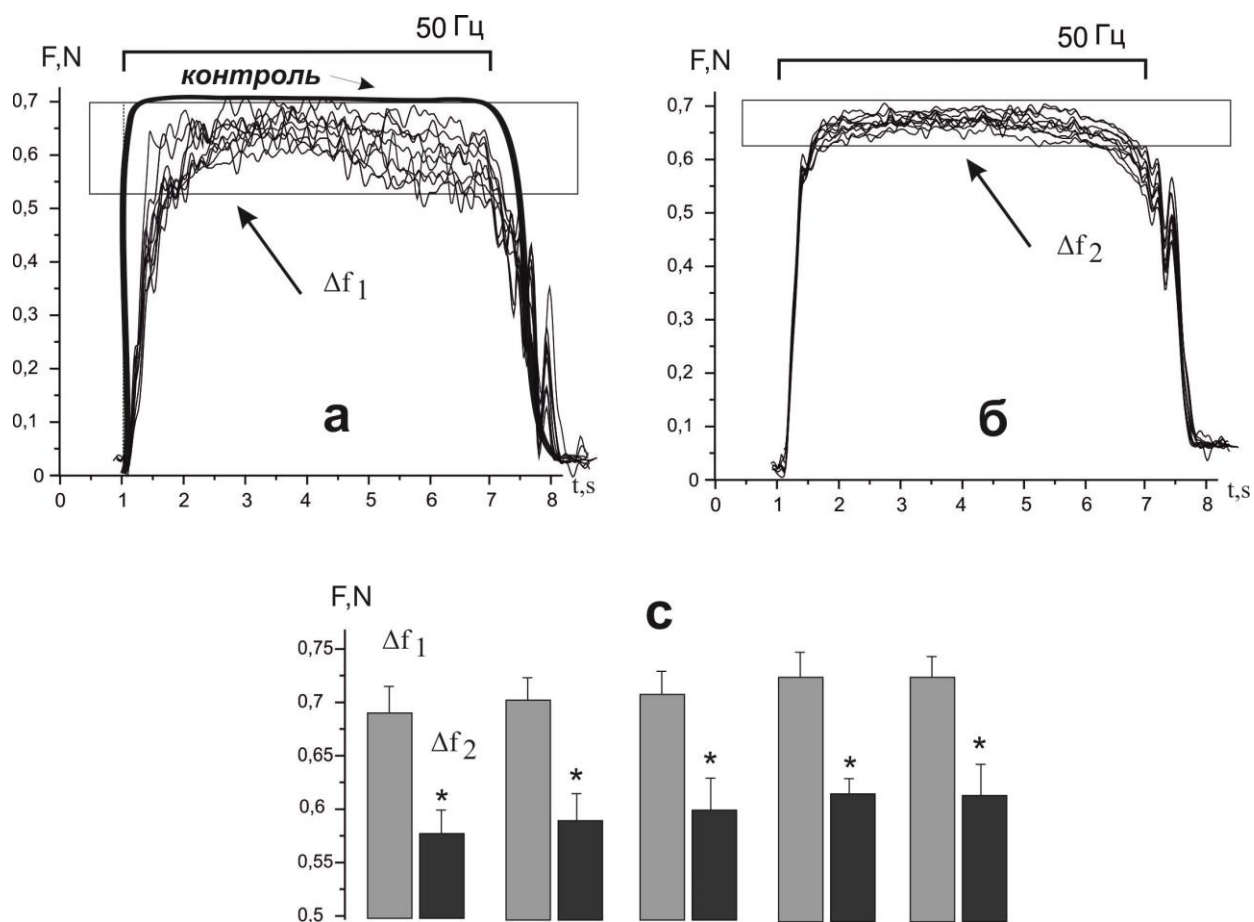


Рисунок 3.2. Механограми *musculus soleus* алкоголізованого щура при внутрішньочеревному введенні C_{60} фулерену в концентрації 1 мг/кг.

а,б – механограми алкоголізованих тварин та тварин з введенням розчином C_{60} фулерену, с – розмір флуктуаційних коливань в продовж 5 послідовних безрелаксаційних подразнень. Δf_1 та Δf_2 – амплітуда флуктуаційних коливань на фазі утримання максимальної силової відповіді у алкоголізованих тварин та при введенні C_{60} фулерену відповідно. * $p < 0.05$ відносно групи алкоголізованих щурів.

Патологічне збільшення рівня флуктуацій в тетанічних скороченнях алкоголізованих щурів можна пояснити порушеннями рівноваги фізіологічних іонів, передусім Ca^{2+} та дисфункцією транспортних систем мембрани міоцитів. Як відомо для скорочення-розслаблення м'яза необхідне зміна кількості Ca^{2+} в міоплазмі, яке в нормі відбувається із затратами АТФ, енергія гідролізу якої використовується для роботи Ca^{2+} -АТФ-ази, яка транспортує Ca^{2+} в цистерни СР. Якщо врахувати той факт, що під час хронічної алкоголізації в міоплазмі м'язових волокон його концентрація збільшується [142], а під час втоми зменшується рівень АТФ, то цілком можливо що її нестача перешкоджає розщепленню поперчних містків і загалом, повному розслабленню м'яза, оскільки для забезпечення розслаблення саркомерів і наступного актин-сполучного запуску механізму скорочення потрібне повернення рівня іонів Ca^{2+} до початкового стану. Це повертає молекулу тропоніну у вихідне положення, внаслідок чого блокується можливість молекулярної взаємодії міозину й актину. У зв'язку з цим зменшення флуктуаційних коливань при введенні C_{60} фуллерену можна пояснити саме зниженням пошкоджуючих мембрану вільних радикалів. Для підтвердження цього припущення ми проаналізували формування гладкого тетанічного скорочення з фази зубчастого тетанусу. (рис.3.5).

На всьому протязі формування гладкого тетанусу в хронічно алкоголізованих щурів спостерігався тремор максимальних силових відповідей. Час встановлення гладкого тетанусу суттєво збільшився і склав 3864 мс, при контрольних значеннях -3545мс. Після введення фуллерену C_{60} цей час склав 3611мс, що майже відповідало контрольним значенням.

Таким чином фіксується значний терапевтичний ефект дії застосованого фуллерену на формування гладкого тетанічного скорочення, що в свою чергу впливає на зменшення рівня флуктуаційних коливань при скороченнях алкоголізованого м'язу. На нашу думку це пов'язано саме зі зменшенням

кількості вільних радикалів в процесі п'ятиденного терапевтичного введення C₆₀ фулерену.

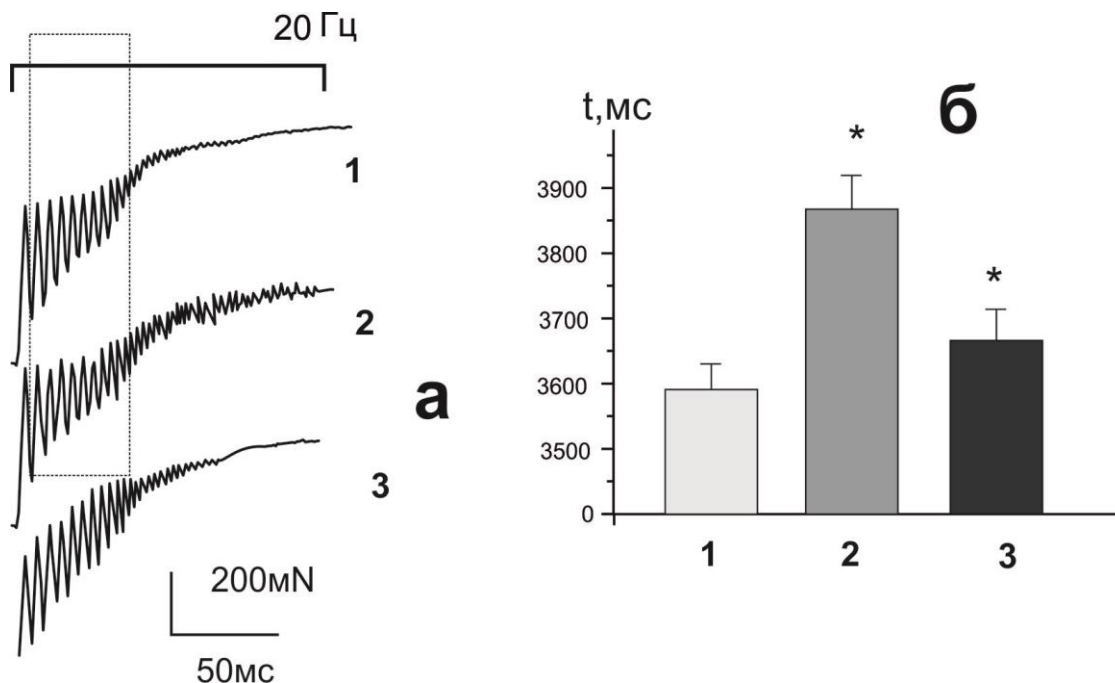


Рисунок 3. 5. Біомеханічні параметри переходу *musculus soleus* з зубчастого в гладкий тетанус при застосуванні стимуляційного подразнення частотою 20Гц.

а- механограми алкоголізованих щурів при введенні C₆₀ фулерену

б- час встановлення гладкого тетанусу

1,2,3 – контрольні механограми, механограми алкоголізованих щурів та при введенні C₆₀ фулерену відповідно. *p<0.05 відносно контрольної групи.

Механізм цього явища може бути наступним. Зазначається, що фізичні навантаження у стані алкогольного сп'яніння сприяють Ca²⁺ індукованому вивільненні Ca²⁺. Втім, безпосередньо, C₂H₅OH не здатний спричинити

звільнення Ca^{2+} . Загалом, звільнений таким чином Ca^{2+} створює надлишок іона в саркоплазмі та призводить до утворення вільних радикалів, зокрема H_2O_2 , який в низьких концентраціях (10-100 мМ) активує потенціал-залежні Ca^{2+} -вивільняючі канали і є агоністом $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Відтак, H_2O_2 може патологічно індукувати звільнення Ca^{2+} , втім і сам гідроксильний радикал здатний спричинити короточасне потенціювання сили довільних м'язових скорочень, що збільшує кількість та амплітуду флуктуації сили. Таке його збільшення в міоцитах і призводить до порушення механізмів Ca^{2+} -опосередкованої сигналізації [22], пригнічується здатність Ca^{2+} зв'язуватись із тропоніном С і Ca^{2+} - залежне спряження збудження-скорочення [142]. Це призводить до неможливості міоциту адекватно реалізовувати стимуляційні команди, що веде до затримки встановлення гладких тетанічних скорочень і, як наслідок, до треморних флуктуаційних коливань м'язової сили. Інактивація фулереном значної кількості вільних радикалів зменшує ці каскадні патологічні процеси. Проявом цього є значне зменшення флуктуаційних складових в процесі скорочення.

Для підтвердження біохімічних змін активного м'яза за дії C_{60} фулерену були проаналізовані біохімічні маркери крові, які є також і показниками фізіологічних порушень в м'язовій тканині внаслідок розвитку втоми, яка також відіграє значну роль в формуванні треморних реакцій м'язової системи. (рис.3.6)

Зміна рівня креатеніну - продукту, що утворюється в м'язах при руйнуванні внутрішньом'язових структур, дозволив оцінити рівень пошкодження міоцитів при розвитку алкогольної міопатії. Цей показник збільшився з $52 \pm 2 \mu\text{M} / \text{l}$ в контролі до $123 \pm 5 \mu\text{M} / \text{l}$ після алкоголізації щурів. П'ятиденне введення C_{60} ФВР знизило цей показник до $64 \pm 2 \mu\text{M} / \text{l}$. На нашу думку, зменшення фракції креатиніну обумовлено тим, що молекули C_{60}

захищають мембрани клітин скелетних м'язів від неспецифічного вільнорадикального руйнування, ефективно поглинаючи активні форми кисню.

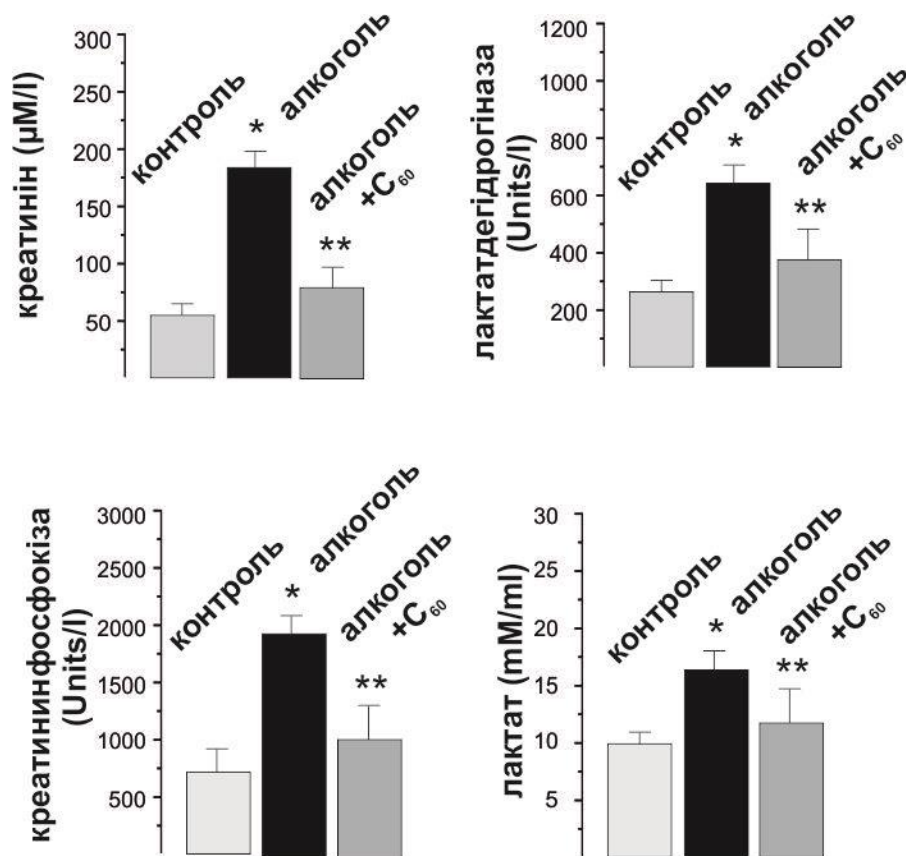


Рисунок 3.6 . Біохімічні показники крові алкоголізованих щурів.

* $p < 0.05$ щодо групи контроль; ** $p < 0.05$ щодо групи алкоголізованих щурів без введення водного розчину C₆₀-фуллерену.

В активному м'язі більшість метаболічних і біохімічних процесів відбуваються в анаеробних умовах, м'яз використовує значну кількість мітохондріальних ферментів і, як наслідок, в ньому накопичується велика кількість лактату, який не встигає окислюватися. У контрольній групі рівень LA склав 12 ± 1 mM / ml. Після алкоголізації його значення збільшилося до 17 ± 1

mM / ml. Ін'єкції C₆₀ФВР знизили рівень LA до 13 ± 1 mM / ml. Таким чином, фуллеренова терапія привела до збільшення окислення лактату майже на 40%.

Збільшення фракції LDH в крові до 622 ± 11 од/л є результатом як фізіологічної руйнування стінок міоцитів, викликаних виконанням ними роботи [23], так і збільшенням вмісту лактату при активації м'яза. Введення C₆₀ФВР зменшило рівень LDH до 311 ± 11 од/л. Зменшення цього ферменту при введенні C₆₀ FAS може свідчити як про зменшення механічного пошкодження м'язових волокон, так і про зменшення концентрації молочної кислоти в м'язовій системі.

СРК- фермент, який у високій концентрації присутній в скелетних м'язах. При пошкодженні м'язів спостерігається вихід цього ферменту з клітин і, відповідно, зростання його активності в плазмі крові. Збільшення фракції СРК в крові при розвитку алкогольної міопатії з 560 ± 13 од/л в контролі до 1680 ± 22 од/л є результатом швидкого фізіологічного руйнування стінок міоцитів, що посилюється при активному тривалому безрелаксаційном скороченні м'яза. При введенні C₆₀ФВР рівень СРК істотно знизився (більш ніж в три рази) і склав 871 ± 23 од/л.

З функціональної точки зору ці дані вказують на те, що велика кількість високоенергетичних фосфатних сполук витрачається пошкодженою м'язовою клітиною на підтримання гомеостазу, і, як наслідок, відбувається порушення обміну речовин, що призводить до значного зростання стомлюваності м'яза. Таким чином, ін'єкції C₆₀ФВР істотно підвищують енергетичні можливості м'язової системи.

Представлені дані свідчать, що розчини фулерену C₆₀, мають виражений захисний ефект на динаміку скорочення *musculus soleus* при розвитку алкогольної міопатії та можуть розглядатися як перспективні лікарські засоби для профілактики і корекції міотичних пошкоджень.

3.3. Аналіз розвитку втомних процесів при розвитку алкогольної міопатії.

Проведено аналіз розвитку процесів втоми при алкогольній міопатії та після 2-х місяців реабілітаційного періоду, при застосуванні 1 герцової, безлексаційної стимуляції, що дала можливість оцінити процес втоми в різних часових проміжках (рис.3.7).

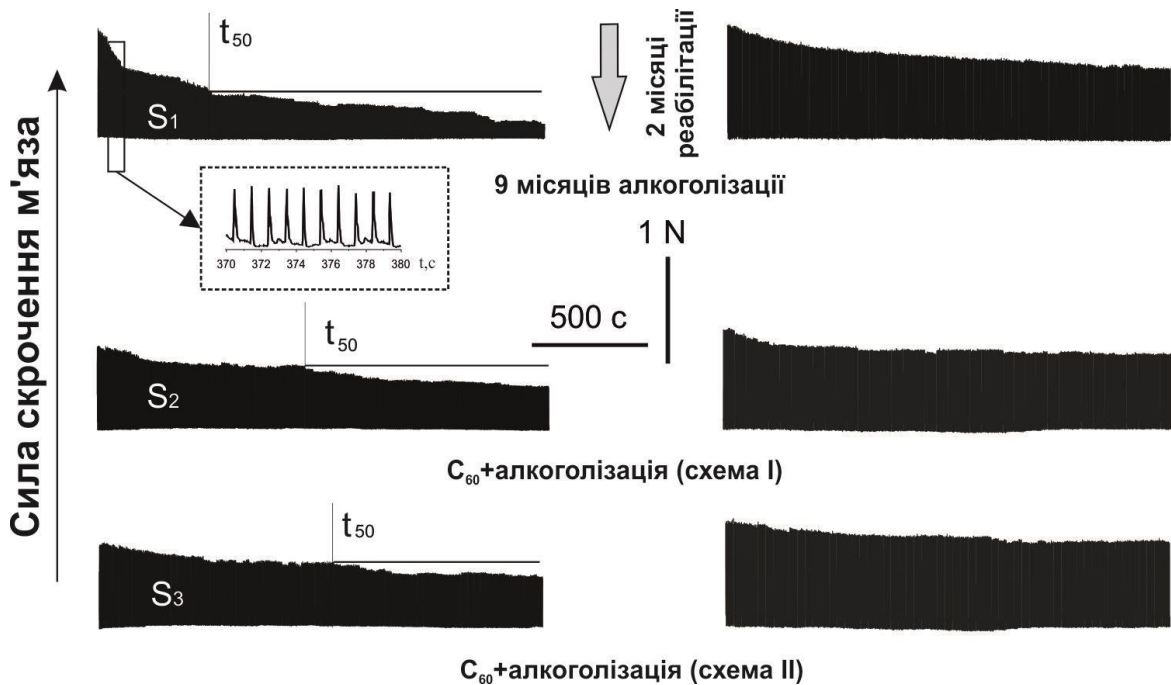


Рис. 3.7. Сила скорочення musculus soleus щурів, викликана 1 Гц безрелаксаційною стимуляцією тривалістю 1800 с, після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та через 2 місяця після припинення вживання алкоголю.

S – імпульс сили м'яза (розрахована площа під силовою кривою); t_{50} - час досягнення силою 50% рівня від початкового значення; алкоголізація – щури, які одержували алкоголь упродовж експерименту; С₆₀+алкоголізація – щури, які одержували алкоголь і С₆₀ФВР (1 мг/кг) упродовж експерименту за різних схем

введення наносполуки: через 1 год після прийому алкоголю (схема I) та разом з алкоголем (схема II).

Оцінка розвитку втоми проводили методом розрахунків часових інтервалів при досягненні 50 % рівнів силових відповідей, при стимуляційних подразненнях. Слід зазначити, що у контрольних значеннях зміни цього показника мала тривалі часові рамки, які складали декілька годин. При реєстрації силових відповідей алкоголізованих тварин виявлено різке зниження силової активності м'яза вже на 1 стимулі з його зменшенням, що прогресує, до 50-70% від контрольних значень наприкінці досліду. У щурів, що одержували разом алкоголь і C_{60} , простежується збільшення силової відповіді м'яза протягом усього експерименту порівняно з щурами групи (алкоголізація) на 40-45% та в порівнянні з схемою (схема I) - на 12-15%. Для якіснішого аналізу отриманих результатів ми провели аналіз змін основних біомеханічних маркерів м'язової активності (рис. 3.7, 3.8).

Час зменшення силової відповіді м'яза на 50% від початкового (контроль) значення (t_{50}) склало 1241 ± 25 с. у групі алкоголізованих тварин. При застосуванні C_{60} ФВР цей час склав 1521 ± 13 (схема I) і 1675 ± 15 с. (схема II). Таким чином, позитивний ефект застосування C_{60} ФВР за схемою II і схемою I склав 34% та 10%, відповідно, порівняно з групою алкоголізованих тварин. Зазначимо, що після 2-х місячної реабілітації часу зменшення силової відповіді на 50% від початкового (група алкоголізованих тварин) значення не було зафіксовано у групах тварин « C_{60} +алкоголізація» (рис. 3.8).

Зміна рівня мінімальної сили скорочення є одним з найчутливіших маркерів м'язової дисфункції. Його зменшення у групі алкоголізованих тварин склало понад 70% ($1,15$ Н у контролі). При застосуванні C_{60} ВРФ цей показник склав $0,52 \pm 0,05$ Н (схема I) і $0,69 \pm 0,07$ Н (схема II). Позитивний ефект застосування C_{60} ВРФ за схемою II склав понад 70% порівняно з групою

акогелізованих тварин та понад 25% порівняно з групою щурів, які одержували C_{60} ФВР за схемою I (рис. 3.8).

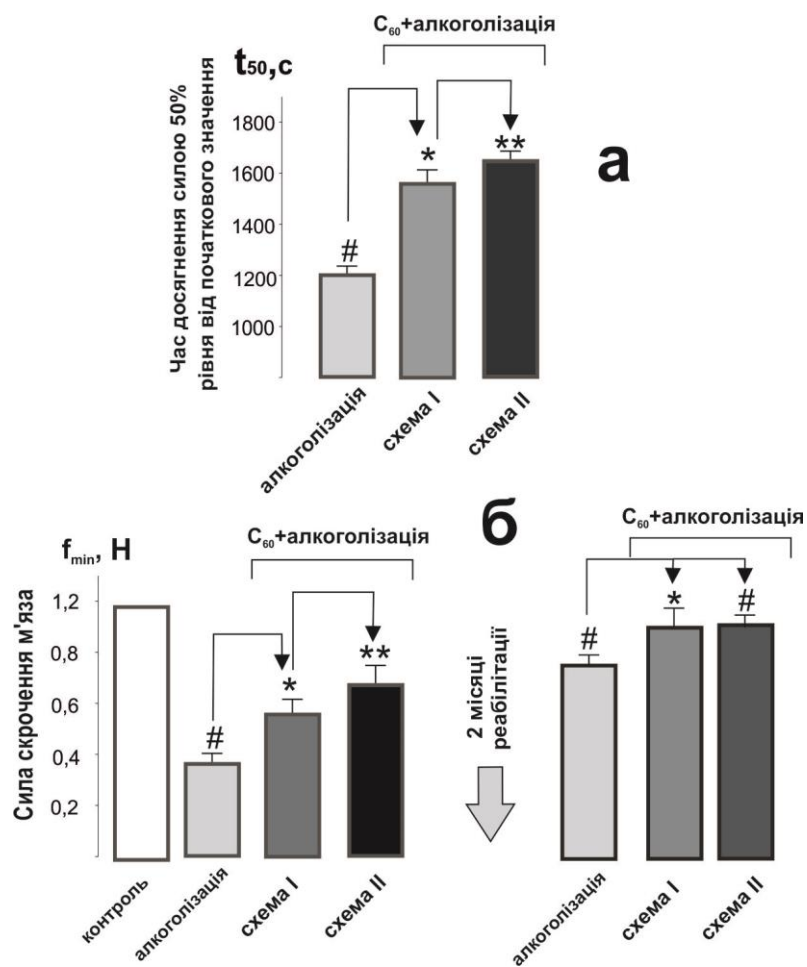


Рис. 3. 8. Біомеханічні маркери скорочення musculus soleus щурів при застосуванні 1 Гц стимуляції тривалістю 1800 с після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та через 2 місяця після припинення вживання алкоголю.

алкоголізація – щури, які одержували алкоголь упродовж експерименту; C_{60} +алкоголізація – щури, які одержували алкоголь і C_{60} ФВР (1 мг/кг) упродовж експерименту за різних схем введення наносполуки: через 1 год після прийому алкоголю (схема I) та разом з алкоголем (схема II); а - час досягнення силою 50% рівня від початкового значення (t_{50}); б - мінімальний рівень силової відповіді м'яза на останньому скороченні стимуляційного тесту (f_{min}); # $p < 0,05$ щодо групи

контроль; * $p < 0,05$ щодо групи алкоголізованих тварин; ** $p < 0,05$ щодо групи щурів, які одержували C_{60} ФВР за схемою I.

Після 2-х місячної реабілітації рівень мінімальної сили скорочення у групі алкоголізованих тварин склав $0,73 \pm 0,1$ Н, що майже на 40% менше порівняно з контролем (рис. 3). Застосування C_{60} ФВР в обох схемах показало рівень мінімальної сили $0,99 \pm 0,1$ Н, який відрізнявся приблизно на 15% щодо групи алкоголізованих тварин. Важливо зазначити також, що у групах тварин « C_{60} +алкоголізація» майже відсутня відмінність між максимальною та мінімальною силами м'язового скорочення, а саме значення їх різниці відповідає за якість та ефективність виконання точнісних рухів.

Аналіз величини імпульсу сили м'яза дозволяє оцінити рівень м'язової активності у системі рівноваги «сила – зовнішнє навантаження», що є фізіологічним аналогом працездатності м'язової системи. Значення цього параметру в групі акоголізованих тварин склала $23 \pm 1\%$ від контролю, прийнятого за 100%. При застосуванні C_{60} ВРФ цей показник склав $61 \pm 2\%$ (схема I) і $72 \pm 3\%$ (схема II).

Навіть після 2-х місячної реабілітації рівень імпульсу сили м'яза в групі акоголізованих тварин склав $68 \pm 4\%$, що слугує доказом суттєвих патологічних змін у м'язовій тканині, які відбулися за 9-ти місячної алкоголізації тварин. Застосування C_{60} ВРФ виявило суттєве збільшення цього показника: до $86 \pm 4\%$ (схема I) і майже до контрольних значень - $94 \pm 2\%$ (схема II) (рис. 3.9).

На нашу думку, описані вище позитивні ефекти впливу водорозчинних C_{60} фулеренів пов'язані саме з їх потужними антиоксидантними властивостями ефективно інактивуючи АФК, вони зменшують кількість пошкоджених міоцитів і, таким чином, знижують ступінь тяжкості алкогольної міопатії.

Таким чином, показано, що рівень розвитку патологічних процесів у скелетному м'язі щурів на тлі їх тривалої хронічної алкоголізації зменшується

при застосуванні як потенційного терапевтичного агента водорозчинного C_{60} фулерену в дозі 1 мг/кг.

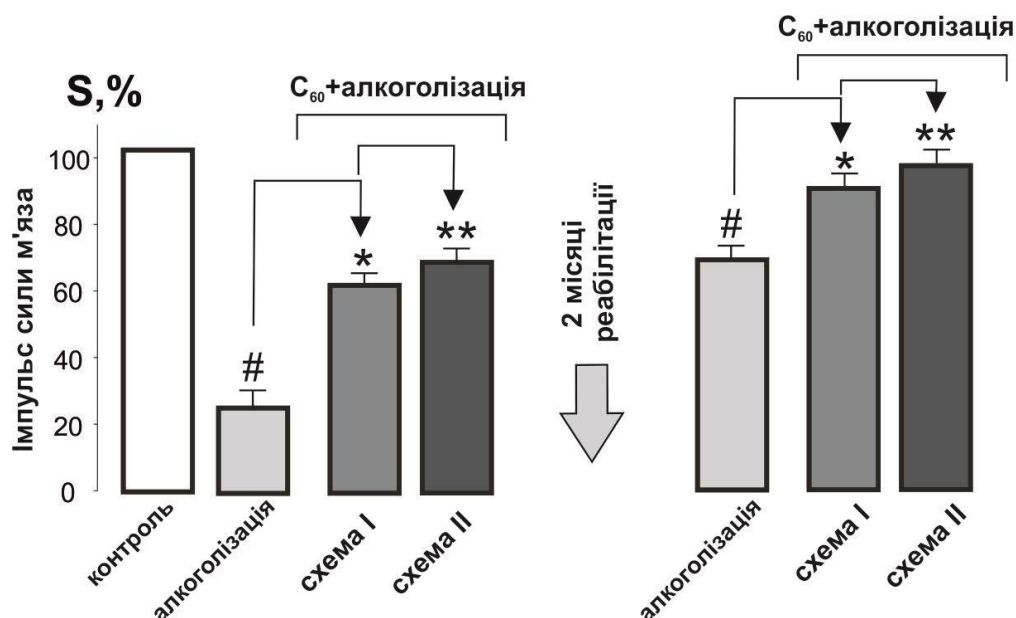


Рис. 3.9. Імпульс сили м'яза (S) при застосуванні 1 Гц стимуляції тривалістю 1800 с після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та через 2 місяця після припинення вживання алкоголю.

алкоголізація – щури, які одержували алкоголь упродовж експерименту; C_{60} +алкоголізація – щури, які одержували алкоголь і C_{60} ФВР (1 мг/кг) упродовж експерименту за різних схем введення наносполуки: через 1 год після прийому алкоголю (схема I) та разом з алкоголем (схема II); # $p < 0,05$ щодо групи контроль; * $p < 0,05$ щодо групи алкоголізованих тварин; ** $p < 0,05$ щодо групи щурів, які одержували C_{60} ФВР за схемою I.

Крім того, покращуються процеси відновлення механокінетичних параметрів скорочення *musculus soleus* після припинення алкоголізації. Можна стверджувати, що запропонована схема введення C_{60} ФВР разом з алкоголем є найбільш ефективною та потребує подальших до клінічних випробувань.

3.4. Вплив C₆₀ фулеренів на відновлення динаміки скорочення *musculus soleus* щурів після хронічної алкоголізації

Низькочастотна стимуляція забезпечує можливість ефективно аналізувати розвиток м'язової втоми. Через 1 місяць після припинення алкоголізації та застосуванні безрелаксаційної стимуляції заданої тривалості зафіксоване суттєве зменшення силової відповіді м'яза (рис.3.10). В випадку алкоголізації з суміщу алкоголю і C₆₀ФВР, процеси розвитку м'язової втоми відрізнялись від контрольних значень на 5-10%. Так, імпульс м'язової сили після стимуляції протягом 600 секунд в контрольних тестах склав $96\pm 2\%$ від початкового рівня, в випадку алкоголізації цей показник склав $63\pm 3\%$, а в випадку алкоголізації з суміщу алкоголю і C₆₀ФВР - $84\pm 2\%$ (рис.3.11).

Зміна рівня мінімальної сили скорочення є одним із найчутливіших маркерів м'язової дисфункції. В контрольних тестах на останньому скороченні цей показник був на рівні $0,87\pm 0,5$ Н, в алкоголізованих щурів - $0,63\pm 0,7$ Н та у групі, яка отримувала суміш алкоголю та фулерену склав $0,84\pm 0,4$ Н. Зміна рівня максимальної сили скорочення є показником загальної дисфункції м'язової системи, що свідчить про зниження максимально можливої силової відповіді при розвитку патології

Зміна цього маркера склала в контрольних значеннях $0,85\pm 0,6$ Н та в випадках використання алкоголю та суміші алкоголю і фулерену - $0,56\pm 0,4$ Н, та - $0,78\pm 0,6$ Н відповідно. Слід зазначити, що в випадку alcoholization+C₆₀ майже відсутня різниця між максимальною та мінімальною силою скорочення, а саме рівень цієї різниці відповідальний за якість виконання точнісних рухів. Таким чином, остаточний ефект патологічних змін скелетного м'язу, викликаних 9-ти місячної алкоголізацією, навіть через місяць після припинення прийому алкоголю склав 27 % за показниками м'язової потужності, 46 % за мінімальною

силою та знизився на 34% - за показниками максимальної сили скорочення. У випадку alcoholization+C₆₀ різниця між контрольними значеннями була найбільшою (до 10%) в імпульсі м'язової мили. Максимальні та мінімальні значення майже не відрізнялись від контрольних значень.

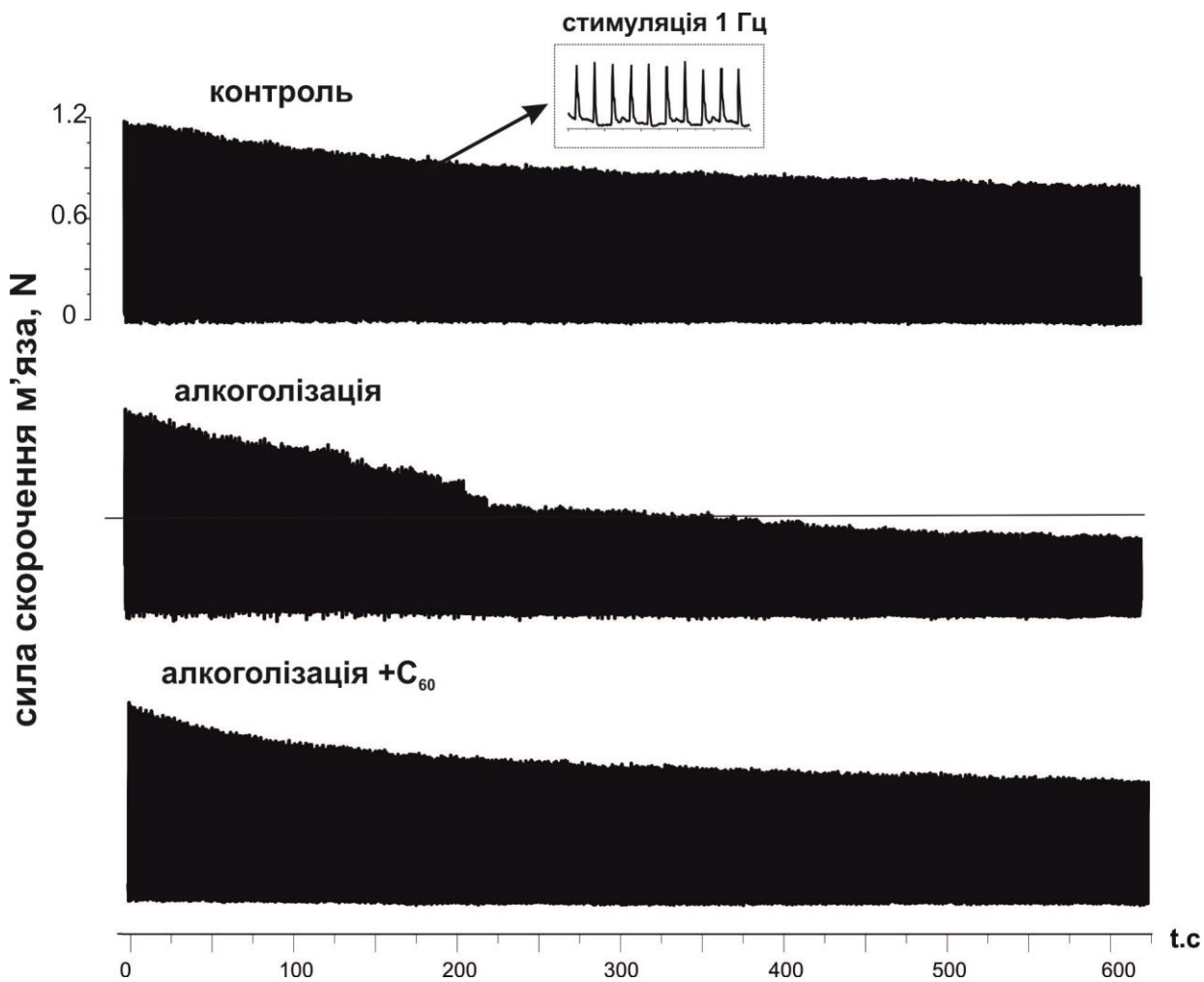


Рис.3.10. Сила скорочення *musculus soleus* щурів через 1 місяць після припинення 9-ти місячної алкоголізації при застосуванні 1 Гц стимуляції тривалістю 600с.

алкоголізація, алкоголізація+C₆₀ - щури одержують алкоголь і суміш алкоголю і фулерена C₆₀ у концентрації 1 мг/кг протягом усього періоду алкоголізації.

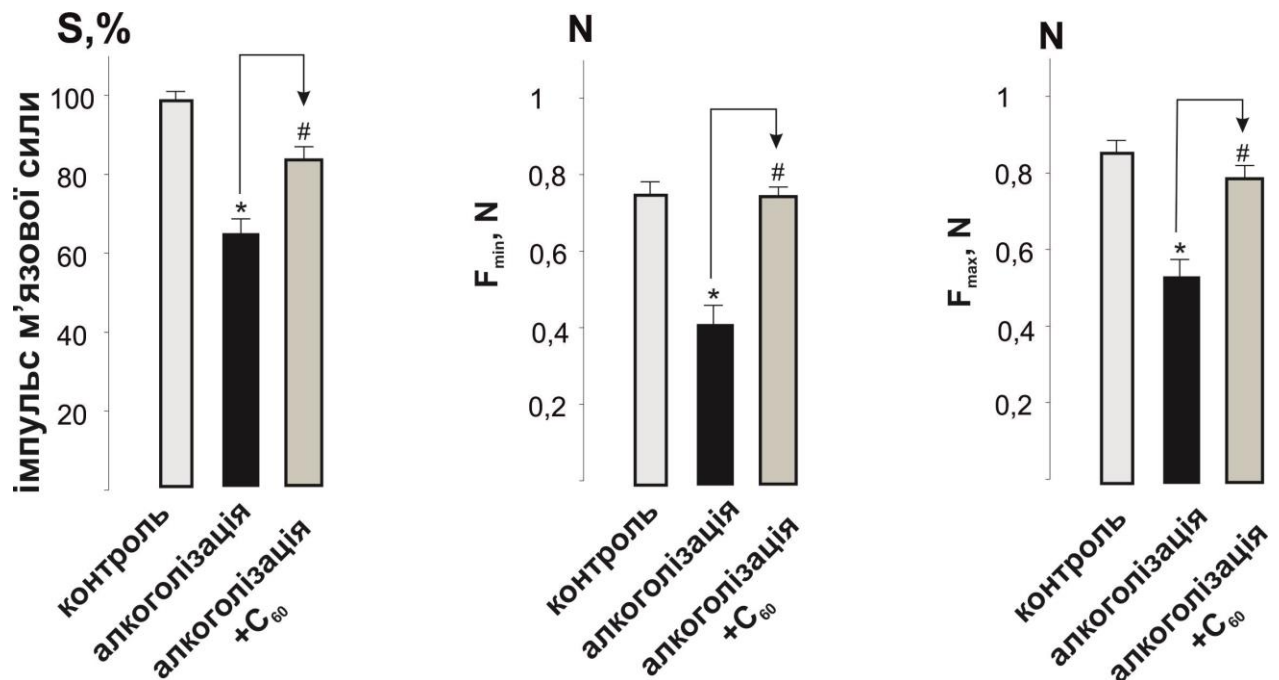


Рис.3.11. Рівні біомеханічних маркерів скорочення *musculus soleus* алкоголізованих щурів, при застосуванні 1-герцевої стимуляції тривалістю 600 секунд.

алкоголізація, алкоголізація+C₆₀ - щури одержують алкоголь і суміш алкоголю і фулерена C₆₀ у концентрації 1 мг/кг протягом усього періоду алкоголізації, S – інтегрована потужність м'язового скорочення розрахована за загальною площею силової кривої, F_{max}, F_{min} - мінімальний та максимальний рівень на останньому скороченні стимуляційного тесту. *p<0.05 - щодо групи контроль, **p<0.05 - щодо групи алкоголізація.

Для підтвердження отриманих біомеханічних результатів після стимуляційних скорочень ми провели аналіз біохімічних показників плазми крові, які використовують для діагностики розвитку м'язових міопатій [143]. Зокрема, зміни рівнів креатиніну, креатинфосфокінази, лактату та

лактатдегідрогенази, дали можливість оцінити фізіологічний стан *musculus soleus* після припинення тривалої алкоголізації тварин.

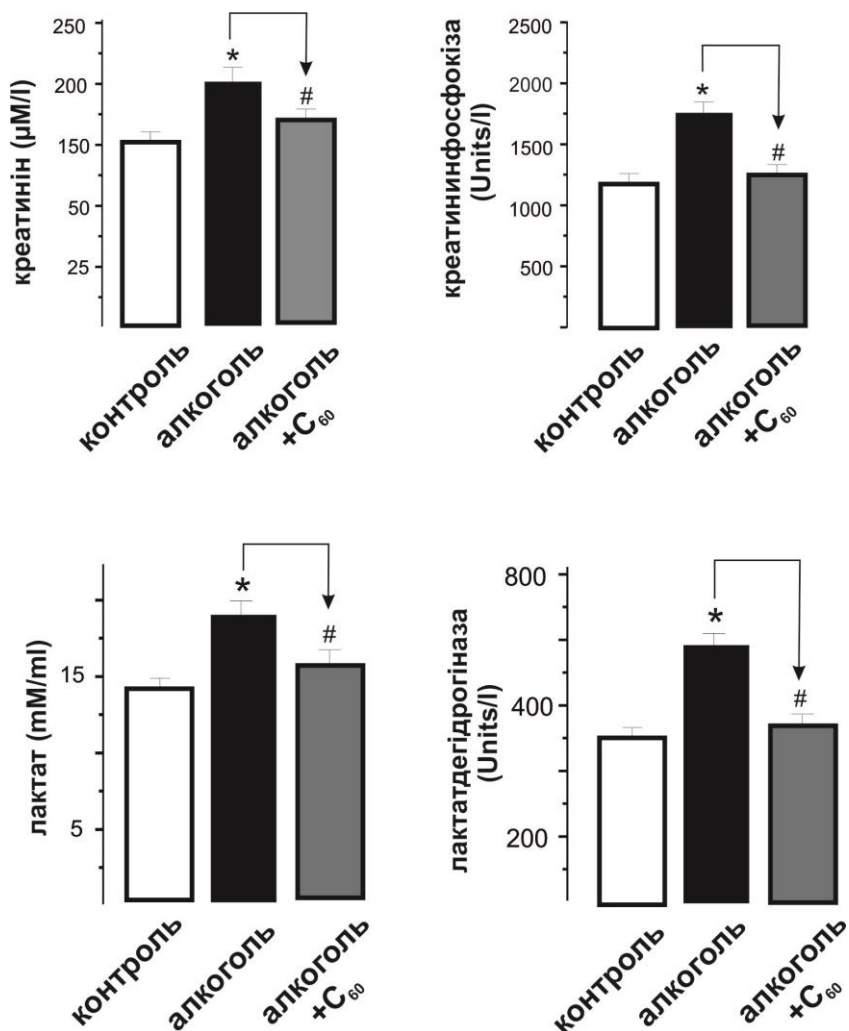


Рис.3. 12. Зміни рівнів креатиніну, лактатдегідрогенази, лактату та креатинфосфокінази у крові алкоголізованих щурів після застосування безрелаксаційної 1-герцевої стимуляції тривалістю 600 секунд.

алкоголь – алкоголізовані щури, алкоголь+C₆₀ - щури одержують суміш алкоголю та фулерену C₆₀ у концентрації 1 мг/гк протягом усього періоду алкоголізації, контроль – інтактні щури. *p<0.05 - щодо групи контроль; **p<0.05 щодо групи алкоголь

Вміст креатиніну в контрольних вимірах після стимуляційних скорочень піднявся з $72 \pm 3\%$ $\mu\text{M/l}$ (нативні виміри) до $156 \pm 5\%$ $\mu\text{M/l}$.

В випадках 9-ти місячної алкоголізації ці показники склали $209 \pm 9\%$ $\mu\text{M/l}$, а в випадках суміші алкоголю та $\text{C}_{60}\text{ФВР}$ рівень знизився на $20,5 \pm 1\%$ і склав $166 \pm 8\%$ $\mu\text{M/l}$.

Вміст креатинфосфокінази піднявся з $870 \pm 7\%$ Units/l до $1240 \pm 9\%$ в контрольних вимірах, та збільшився до $1760 \pm 17\%$ Units/l в випадку хронічної алкоголізації. При сумісному застосуванні алкоголю та C_{60}FAS рівень креатинфосфокінази знизився на $25 \pm 1\%$ та склав $1305 \pm 19\%$ Units/l.

Рівень лактату в нативному виміру після стимуляційних скорочень досяг $13,9 \pm 0,4\%$ mM/ml. В алкоголізованих щурах цей показник склав $17,1 \pm 0,4$ mM/ml та $14,1 \pm 0,6$ mM/ml при застосуванні C_{60}FAS . Таким чином позитивний ефект фулерену на цей маркер склав $17,4 \pm 0,3\%$.

Концентрація лактатдегідрогенази знизилась з $472 \pm 7\%$ Units/l в алкоголізованих щурах до $371 \pm 9\%$ в випадку використання фулерену. Позитивний ефект фулерену на цей маркер склав $21,3 \pm 0,9\%$.

Таким чином, зміни біохімічних маркерів міотичного пошкодження м'язової тканини чітко корелюють з описаними вище біомеханічними маркерами.

Поясненням отриманого позитивного терапевтичного ефекту водорозчинних C_{60} фулеренів можуть бути їх потужні антиоксидантні властивості. Визначення змін рівнів про- та антиоксидантного балансу в тканинах досліджуваного м'яза є необхідним для підтвердження цієї гіпотези.

Ендогенна система антиоксидантного захисту організму, на початку розвитку алкогольної міопатії може нейтралізувати лише невеликі кількості АФК ферментативними (такими як супероксиддисмутаза (SOD) та каталаза (CAT) шляхами. Але надмірна активність супероксиддисмутази може призвести

до надмірного вироблення H_2O_2 , що призводить до циклічного розвитку міотичних пошкоджень [144].

Одним із наслідків хронічного вживання алкоголю, є дисфункція мітохондрій, внаслідок чого продукується ще більше вільних радикалів [145].

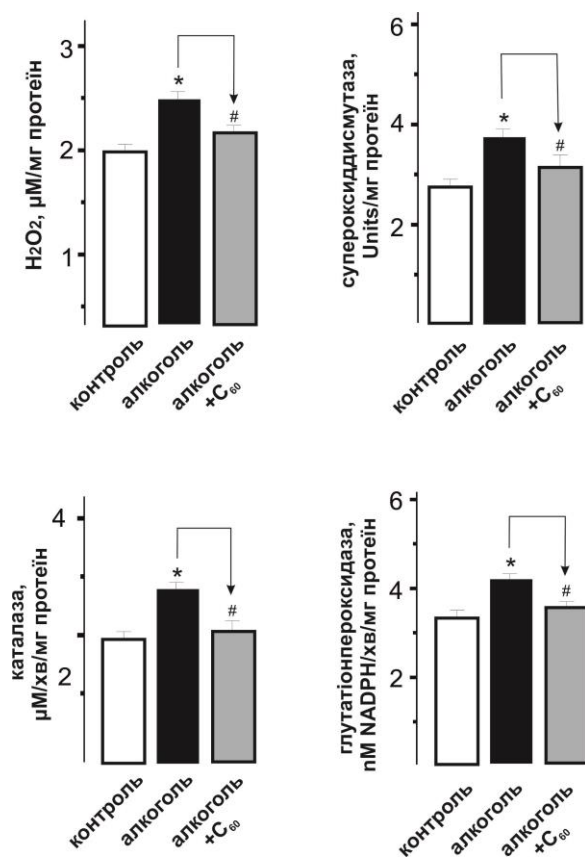


Рис.3. 13. Показники про- та антиоксидантного балансу у гомогенаті *musculus soleus* алкоголізованих щурів після застосування безрелаксаційної 1-герцевої стимуляції тривалістю 600 секунд.

алкоголь – алкоголізовані щури, алкоголь+C₆₀ - щури одержують суміш алкоголю та фулерену C₆₀ у концентрації 1 мг/кг протягом усього періоду алкоголізації, контроль – інтактні щури. * $p < 0.05$ - щодо групи контроль; ** $p < 0.05$ щодо групи алкоголізація.

Виходячи з цього, головним у патогенезі при надмірному впливі вільних радикалів є зниження активності антиоксидантних систем (рис.3.13.), а саме: супероксид-дисмутази (SOD), глутатіонпероксидази (GPX) і каталази [146].

Вміст H_2O_2 в контрольних вимірах після стимуляційних скорочень піднявся з $1,6 \pm 0,3\%$ до $1,9 \pm 0,2\%$ $\mu M/мг$ протеїну. Хронічна алкоголізація збільшила ці показники до $2,4 \pm 0,2\%$ а в випадках суміші алкоголю та $C_{60}FAS$ рівень знизився на $16,9 \pm 0,4\%$ і склав $12,5 \pm 0,2\%$ $\mu M/мг$ протеїну.

Вміст SOD склав: $2 \pm 0,3\%$, $2,9 \pm 0,5\%$, $3,8 \pm 0,5\%$ та $3,1 \pm 0,2\%$ U/мг протеїну в випадках нативних, контрольних, алкоголізації та сумісному застосуванні алкоголю та $C_{60}FAS$ відповідно. Позитивний вплив розчинів фулерену склав $18,5 \pm 0,3\%$.

Активність CAT в нативному виміру після стимуляційних скорочень досягла $2,4 \pm 0,2\%$ $\mu M/хв/мг$ протеїну. В алкоголізованих щурах цей показник склав $3,1 \pm 0,2$ та $2,5 \pm 0,3$ $\mu M/хв/мг$ протеїну при застосуванні $C_{60}FAS$. Таким чином позитивний ефект фулерену на цей маркер склав $19,3 \pm 0,2\%$.

Активність GPx знизилась з $4,2 \pm 0,4\%$ nM NADPH/ хв/мг протеїну в алкоголізованих щурах до $3,1 \pm 0,2\%$ в випадку використання фулерену. Позитивний ефект фулерену на цей маркер склав $26,3 \pm 1\%$.

Таким чином отримані дані показують, що фулерени C_{60} сприяють найшвидшому відновленню скелетно-м'язових структур після хронічної алкоголізації та адекватному клітинному функціонуванню міоцитів за рахунок зміни клітинного окислювально-відновного стану та активності ферментів. Хімічна структура фулерен з великою кількістю сполучених подвійних зав'язків і низькорозташованими нижніми незайнятими молекулярними орбіталями робить його дуже сприйнятливим до вільних радикалів.

Завдяки цьому фулерен C_{60} може реагувати з багатьма супероксидами, при цьому не втрачаючи свої антиоксидантні властивості і подальша розробка медичних нанотехнологій із застосуванням C_{60} ФВР, з урахуванням їх антиоксидантних властивостей, та відсутністю даних про гострі чи хронічні інтоксикації, викликані фулеренами, відкриває нові можливості у терапії та профілактиці алкогольної міопатії.

3.5. Концентрація алкоголю у крові піддослідних щурів.

Після завершення експерименту концентрація алкоголю у крові щурів після хронічного споживання етанолу варіювалася від 140 mg/dl (3 місяці алкоголізації) до 280 mg/dl (9 місяців алкоголізації) (рис. 3.14). Ці дані добре узгоджуються з подібними дослідженнями [147]. Прийом C_{60} ФВР у дозі 1 мг/кг у терапевтичній (разом із алкоголем) схемою призвів до суттєвих змін даних показників протягом усього експерименту.

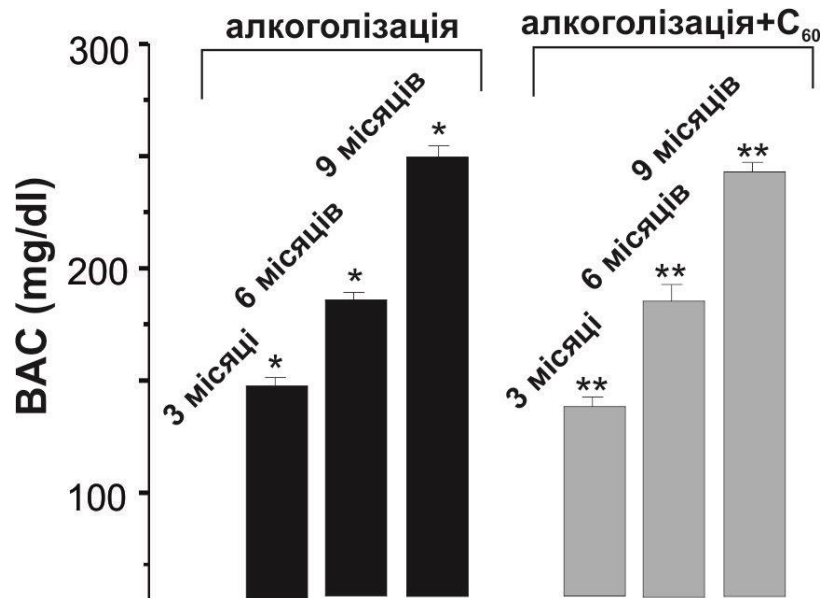


Рисунок 3.14. Концентрації алкоголю у крові після хронічного вживання етанолу.

алкоголізація+C₆₀ (1 мг/кг) - щури одержують суміш алкоголю та фулерену C₆₀ у концентрації 1 мг/гк протягом усього періоду алкоголізації, 3,6,9 місяць – алкоголізація тривалістю 3,6 та 9 місяців відповідно, *p<0.05 - щодо групи контроль, **p<0.05 - щодо групи алкоголізація

3.6. Гістологічні дослідження.

У результаті проведеного гістологічного аналізу показано, що у алкоголізованих щурів більшість м'язових волокон тонша, ніж у контрольної групи, а середній діаметр волокон зменшується до $24,4 \pm 1.4$ мкм (рис. 3.15, табл. 1). Спостерігаються звивисті волокна. Деякі з них мають нерівномірну товщину вздовж волокна.

Окремі м'язові волокна були вакуолізовані, що свідчить про деструктивні процеси в них. У деяких з них поперечна смугастість менш чітка, що може свідчити про порушення правильного просторового розташування актин-міозинових комплексів та каркасних білків, зокрема титину та небуліну. У тонких пучках є також волокна нормальної товщини (рис. 3.15 В).

Прошарок сполучної тканини між м'язовими волокнами збільшений (рис. 3.15 Е). У результаті площа, зайнята сполучною тканиною, збільшується до $0,21 \pm 0,02$ мкм² на 1 мкм² площі поперечного перерізу м'яза (табл. 3.1). Також спостерігається склероз і фіброз.

У алкоголізованих щурів, які отримували C₆₀-фулерени, товщина м'язових волокон не зменшувалася порівняно з контрольною групою. Склероз і фіброз виражені у меншій мірі. Отже, патогістологічні прояви у цій групі щурів менш виражені (табл. 1; рис. 3.15-С,Ф).

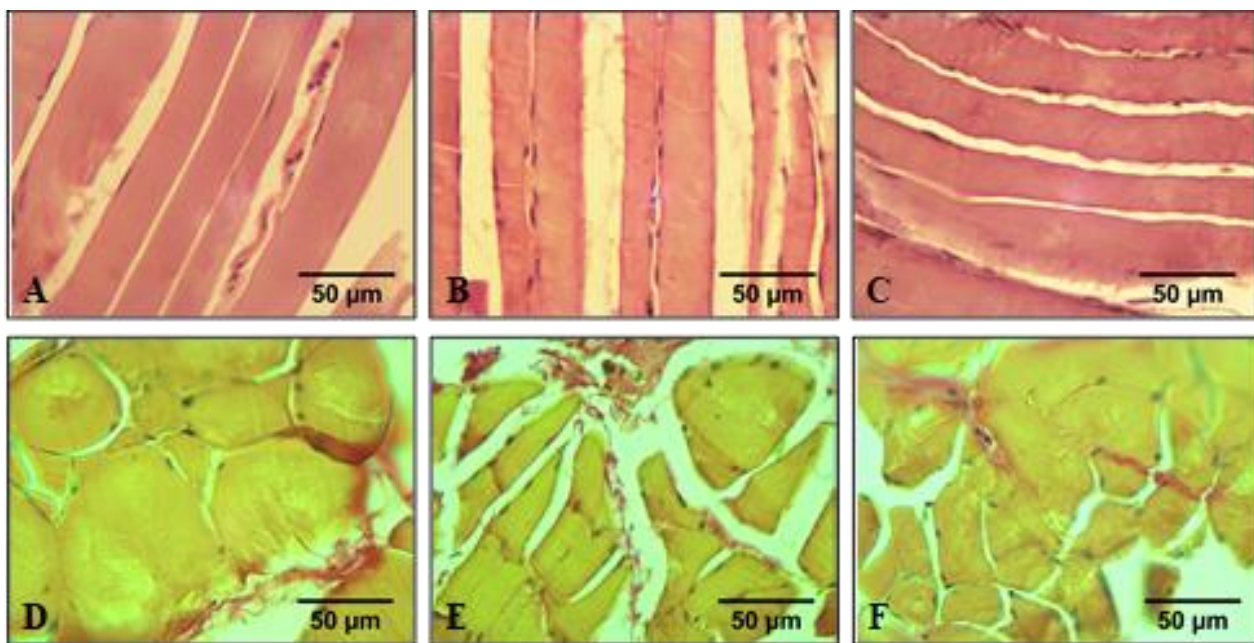


Рисунок 3.15. Поперечні прерези волокон *musculus soleus*: А і D – контрольна група; В і Е – група алкоголю; С і F – спирт + C₆₀-фуллереновая група. А, Б, В – забарвлення гематоксиліном та еозином; D, Е, F – фарбування гематоксиліном і пікрофуксином за ван Гізоном. Масштабні шкали – 50 мкм.

Таблиця 3.1.

Морфометричні дані *musculus soleus* щурів після вживання алкоголю та C₆₀-фулерену.

Групи	Діаметр м'язового волокна, μм	Область, зайнята сполучною тканиною, μм ² /μм ²
контроль	36.7±1.3	0.15±0.02
алкоголь	24.4±1.4*	0.21±0.02*
алкоголь + C ₆₀ фулерен	32.8±2.5^	0.17±0.03

Дані представлені як середнє значення ± SEM

* – p<0.05 (порівняно з контрольною групою)

^ – p<0.05 (порівняно з групою алкоголь)

Добре відомо, що останнім часом з'явилося багато повідомлень про молекулярні механізми, що лежать в основі втрати білка та маси скелетних м'язів після хронічного вживання алкоголю [148, 149].

Результати роботи [152] демонструють індуковане алкоголем зменшення маси та фізіологічної площі поперечного перерізу довгого розгинача пальців (EDL) і підтверджують дані про те, що хронічне вживання алкоголю спричиняє атрофію переважно швидких скелетних м'язів II типу, таких як литковий і підшовний м'язи [150]. Однак зменшення площі поперечного перерізу спостерігається і в повільних волокнах I типу [151].

Атрофія підшовного м'яза в алкоголізованих хронічно щурів не спостерігалася в дослідженнях [153, 154]. Припускають, що волокна I типу захищені від дії етанолу і тому не атрофуються [153, 60]. Однак на людях з хронічною алкогольною інтоксикацією проведено мало досліджень, і питання атрофії м'язових волокон I типу залишається відкритим.

Немировська Т.Л. була першою, хто спостерігав зменшення частки м'язових волокон I типу та незначне збільшення частки гібридних м'язових волокон при хронічному алкоголізмі [153]. У пацієнтів з хронічною алкогольною інтоксикацією цей феномен поки що не спостерігався.

Отримані дані показують, що розробка медичних нанотехнологій із застосуванням C_{60} ФВР, з урахуванням їх антиоксидантних властивостей, та відсутністю даних про гострі або хронічні інтоксикації, викликані фулеренами, відкриває нові можливості в терапії та профілактиці алкогольної міопатії. Можна припустити, що розробка цього напряму може допомогти в терапії інших

патологічних станів м'язової системи, в основі яких лежить патологічна дія вільнорадикальних процесів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

В роботі досліджено біомеханічні параметри скорочення *musculus soleus*, біохімічні показники крові та м'язової тканини щурів після хронічної алкоголізації протягом 3, 6 та 9 місяців. Як терапевтичний агент використовували пероральне введення водного розчину C₆₀ фулерену (C₆₀ФВР) у дозах 0.5, 1 та 2 мг/кг протягом усього експерименту. При аналізі міотичної відповіді оцінювали такі біомеханічні параметри як час зменшення силової відповіді м'яза на 50% від початкового значення, величини сили скорочення та імпульсу сили м'яза.

Введення C₆₀ФВР у кожній з експериментальних груп проводили трьома способами: за 1 годину до прийому алкоголю разом з алкоголем і через 1 годину після прийому алкоголю.

Найбільш суттєві позитивні ефекти були зафіксовані у разі спільного застосування алкоголю та C₆₀ФВР при оптимальній дозі 1 мг/кг. Так, збільшення сили скорочення *musculus soleus* становило 20±1%, 33±2% та 65±3% (p<0.05) порівняно з контролем при 3, 6 та 9-місячній алкоголізації, відповідно. Щури, що одержували C₆₀ фулерен у суміші алкоголем у дозі 1 мг/кг протягом усього періоду алкоголізації, показали більш високий рівень корекції флуктуацій силової відповіді порівняно з його застосуванням до і після прийому алкоголю.

Пероральне вживання C₆₀ВРФ у дозі 1 мг·кг⁻¹ зменшує час виникнення втомлювальних процесів в алкоголізованому м'язі на 11–39% і є найбільш ефективним за тривалого розвитку алкогольної міопатії. Позитивний ефект

C₆₀ВРФ у терапевтичній схемі використання (разом з алкоголем) перевищив на 6–10% його дію у профілактичній (за 1 годину до вживання алкоголю) і терапевтичній (через 1 годину після вживання алкоголю) схемах, відмінність ефектів між якими не спостерігали.

Показано, що у тварин, які перорально одержували алкоголь і C₆₀ФВР (щоденна доза 1 мг/кг) разом (схема II) упродовж експерименту, має місце збільшення силової відповіді м'яза на 40-45% порівняно з групою алкоголізованих тварин та на 12-15% порівняно з групою щурів, які одержували C₆₀ФВР через 1 год після прийому алкоголю (схема I). Позитивний ефект застосування C₆₀ФВР за схемою II і схемою I склав 34% та 10%, відповідно, порівняно з групою алкоголізованих тварин у випадку реєстрації часу зменшення силової відповіді м'яза на 50% від початкового значення.

Після 2-х місячної реабілітації рівень мінімальної сили скорочення м'яза при застосуванні C₆₀ФВР в обох схемах відрізнявся приблизно на 15% щодо групи алкоголізованих тварин, а часу зменшення силової відповіді на 50% достовірно не було зафіксовано. Нарешті, застосування C₆₀ВРФ виявило суттєве збільшення величини імпульсу сили м'яза: до 86±4% (схема I) і майже до контрольних значень - 94±2% (схема II).

Такі біохімічні показники як рівні креатиніну, креатинфосфокінази, лактату та лактатдегідрогенази в крові щурів, а також маркери про- та антиоксидантного балансу (пероксид водню, відновлений глутатіон, активності каталази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази) в тканинах *musculus soleus* зменшились від 15% (3 місяці алкоголізації) до 45% (9 місяців алкоголізації), порівняно з контролем.

Таким чином, рівень розвитку хронічної алкогольної міопатії при застосуванні в якості терапевтичного препарату водний розчин C₆₀ фулерену зменшувався у дослідженому м'язі. Показано, що фулеренова терапія зменшує

час виникнення втомних процесів в алкоголізованому м'язі і є найбільш ефективною при тривалому характері розвитку алкогольної міопатії.

Отримані дані дають можливість стверджувати, що застосування водорозчинних C_{60} фулеренів запобігає негативному впливу активних форм кисню на клітинні та субклітинні структури при розвитку алкогольної міопатії у щурів. Показано, що застосування водорозчинних C_{60} фулеренів сприяє зниженню окисних процесів у м'язах за рахунок підтримки балансу між прооксидантами та системою антиоксидантного захисту, що запобігає негативному впливу активних форм кисню на клітинні та субклітинні структури при розвитку алкогольної міопатії у щурів. На нашу думку, C_{60} фулерен впливає на активність ендогенних антиоксидантів, пригнічуючи виникнення деструкцій у м'язі та, таким чином, зменшує його деградацію. Показано, що, ін'єкції C_{60} ФВР істотно підвищують енергетичні можливості м'язової системи.

Можна стверджувати, що позитивні терапевтичні зміни досліджуваних біомеханічних і біохімічних параметрів підтверджують можливість застосування водорозчинних C_{60} фулеренів в якості потенційних наноагентів, здатних коригувати патологічні стани м'язової системи, що виникають при розвитку алкогольної міопатії, наприклад - тремор.

Представлені дані свідчать, що розчини фулерену C_{60} , мають виражений захисний ефект на скорочення *musculus soleus* при розвитку алкогольної міопатії та можуть розглядатися як багатообіцяючі терапевтичні агенти для запобігання та усунення міотичних пошкоджень. Одержані результати вказують на перспективність використання C_{60} ФВР для відновлення механокінетики скорочення скелетних м'язів за тривалого розвитку алкогольної міопатії.

Одержані дані показують, що розробка медичних нанобіотехнологій на основі водорозчинних C₆₀-фулеренів з урахуванням їх потужних антиоксидантних властивостей та відсутністю даних про гострі або хронічні інтоксикації відкриває нові можливості у профілактиці та терапії алкогольної міопатії. Можна також припустити, що створення нових фармпрепаратів, що включатимуть C₆₀-фулерени, сприятиме ефективному подоланню інших патологій м'язової системи, в основі яких лежить патологічна дія вільнорадикальних процесів.

ВИСНОВКИ

1. Пероральне застосування водного розчину C_{60} фулеренів дозі 1 мг/кг приводить до зменшення рівня розвитку хронічної алкогольної міопатії та зменшення патологічних процесів у скелетному м'язі, що підтверджується аналізом біомеханічних маркерів скорочувального процесу.

2. Використання водного розчину C_{60} фулеренів зменшує час виникнення процесів втоми в алкоголізованому м'язі, сприяє зменшенню рівня флуктуаційних коливань силової відповіді на фазах максимальних силових зусиль і є найбільш ефективним саме при тривалому характері розвитку алкогольної міопатії.

3. Аналіз біохімічних показників плазми крові, змін рівнів про- та антиоксидантного балансу в тканинах досліджуваного м'яза та гістологічні показники дають можливість стверджувати, що застосування водорозчинних C_{60} фулеренів запобігає негативному впливу активних форм кисню на клітинні та субклітинні структури при розвитку алкогольної міопатії.

4. Щури, які отримували C_{60} фулерен у суміші алкоголем у дозі 1 мг/кг протягом усього періоду алкоголізації, показали більш високий рівень корекції флуктуацій силової відповіді порівняно з іншими методами його застосування: за 1 годину та через 1 год після прийому алкоголю.

5. Представлені дані свідчать, що розчини фулерену C_{60} , мають виражений захисний ефект на динаміку скорочення *musculus soleus* при розвитку алкогольної міопатії та можуть розглядатися як багатообіцяючі терапевтичні агенти для запобігання та усунення міотичних пошкоджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pendergast D. R., York J. L., Fisher N. M. A survey of musculus function in detoxified alcoholics. *Alcohol*. 1990. Vol. 7. № 4. Pp. 361 – 366.
2. Estruch R., Nicolas J. M., Villegas E., Junqué A., Urbano-Márquez A. Relationship between ethanol related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men. *Alcohol*. 1993. Vol. 28. № 5. Pp. 543 - 550.
3. Adachi J., Fujita T., Kudo R., Asano M., Nurhantari Y., Ueno Y. 7-Hydroperoxycholesterol and oxysterols as indices of oxidative stress: chronic ethanol feeding and rat skeletal musculus. *Legal Medicine*. 2003. Vol. 5. Pp. 105 - 109.
4. Vancampfort D., Hallgren M., Vandael H., Probst M., Van Hoof P., Firth J. Functional exercise capacity in inpatients with alcohol use disorder versus healthy controls: a pilot study. *Alcohol*. 2020. 82. Pp. 47–52.
5. Nakahara T., Hashimoto K., Hirano M., Koll M., Martin C. R., Preedy V. R. Acute and chronic effects of alcohol exposure on skeletal musculus c-myc, p53, and Bcl-2 mRNA expression. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2003. 285 (6), Pp. 1273-1281.
6. Paice A.G., Hesketh J. E.; Towner, P.; Hirako, M.; Peters, T. J.; Preedy, V. R. No change in apoptosis in skeletal musculus exposed acutely or chronically to alcohol. *Addiction biology*. 2003. 8 (1), Pp. 97–105.
7. Baumann, C.W., Kwak, D., Liu, H.M. & Thompson, L.V. Age-induced oxidative stress: how does it influence skeletal musculus quantity and quality? *Journal of Applied Physiology*. 2016. 121, Pp. 1047–1052.
8. Julian T., Glasgow N., Syeed R., Zis P. Alcohol-related peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*. 2019. 266, Pp. 2907–2919.

9. Nozdrenko D. N., Shut A. N., Prylutskyy Yu. I. The possible molecular mechanism of the nonlinearity musculus contraction and its experimental substantiation. *Biopolym. Cell.* 2005; 21(1). Pp. 80-83.
10. Nozdrenko D. N., Bogutska K. I. About molecular mechanisms of fiber musculus contraction at transition to new equilibrium state: analysis of experimental data using three-componential electrical stimulating signal. *Biopolym. Cell.* 2005. 21(3). Pp. 283-286.
11. Adachi J., Asano M., Ueno Y., Niemelä O., Ohlendieck K., Peters T. J., Preedy V. R. Alcoholic musculus disease and biomembrane perturbations. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2003. Vol. 14. I. 11. Pp. 616 – 625.
12. Pruznak A. M., Nystrom J., Lang C. H. Direct central nervous system effect of alcohol alters synthesis and degradation of skeletal musculus protein. *Alcohol.* 2013. Vol. 48. Pp. 138 - 145.
13. Hong-Brown L. Q., Frost R. A., Lang C. H. Alcohol impairs protein synthesis and degradation in cultured skeletal musculus cells. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2001. Vol. 25. Pp. 1373 - 1382.
14. Eswaran S.V. Water soluble nanocarbon materials: a panacea for all? *Curr. Sci.* 2018. 114. Pp. 1846–1850.
15. Ferreira C.A., D. Ni, Rosenkrans Z.T., Cai W. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials. *Nano Res.* 2018. 11, 4955–4984.
16. Grebinyk A., Grebinyk S., Prylutska S., Ritter U., Matyshevskya O., Dandekar T., et al. C₆₀ fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 2018;124. Pp. 319–327.
17. Halenova T., Raksha N., Savchuk, O., Ostapchenko L., Prylutskyy Y., Ritter U., Scharff P. Evaluation of the biocompatibility of water-soluble pristine C₆₀ fullerenes in rabbit. *BioNanoSci.* 2020. 10. P. 721.

18. Nozdrenko D., Matvienko T., Vygovska O., Scharff P., Ritter U. Protective effect of water-soluble C₆₀ fullerene nanoparticles on the ischemia-reperfusion injury of the musculus soleus in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13), P. 6812.

19. Prylutskyy Yu. I., I. V. Vereshchaka, A. V. Maznychenko, N. V. Bulgakova, O. O. Gonchar, O. A. Kyzyma, U. Ritter, P. Scharff, T. Tomiak, D. M. Nozdrenko, I. V. Mischenko, A. I. Kostyukov. C₆₀ fullerene as promising therapeutic agent for correcting and preventing skeletal musculus fatigue. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017. vol. 15, 1, p. 8.

20. Vereshchaka I.V., Bulgakova N.V., Maznychenko A.V.; Gonchar O.O.; Prylutskyy Yu.I., Ritter U., Moska W., Tomiak T., Nozdrenko D.M., Mischenko I.V., Kostyukov A.I. C₆₀ fullerenes diminish the musculus fatigue in rats comparable to N-acetylcysteine or β-alanine. *Front. Physiol.* 2018, 9. P. 517.

21. Nozdrenko D., Prylutska S., Bogutska K., Nurishchenko N.Y., Abramchuk O., Motuziuk O., Prylutskyy Y., Scharff P., Ritter U. Effect of C₆₀ Fullerene on Recovery of Musculus Soleus in Rats after Atrophy Induced by Achillotenotomy. *Life*. 2022, 12. P. 332.

22. Nozdrenko D., Matvienko T., Vygovska O., Soroca V., Bogutska K., Zholos A., Scharff P., Ritter U., & Prylutskyy Y. Post-traumatic recovery of musculus soleus in rats is improved via synergistic effect of C₆₀ fullerene and TRPM8 agonist menthol. *Applied Nanoscience*. 2022. 2(3). P. 467 – 478.

23. Openshaw H. Neurophysiological study of peripheral neuropathy after high-dose Paclitaxel: lack of neuroprotective effect of amifostine. *Clin. Cancer Res.* 2004. 10. P. 461- 467.

24. Курбасова Н. А. Цатурян. Молекулярные механизмы работы актин-миозинового мотора в мышце. *Успехи биологической химии*. 2011. Т. 51. С. 233–282.

25. Костюк П.Г., Зима В. Л., Магура С. І. Біофізика. Навчальний посібник. К.: Вища школа. 2001. 124 с.
26. Оглобля О. В., Шут А. М., Прилуцький Ю. І. Моделі Ca^{2+} -залежної регуляції скорочення скелетного м'язу. *Доповіді Національної академії наук України*. 2009. № 3. С. 182 – 187.
27. Литвинюк Л.В., Ноздренко Д. Н., Мирошніченко Н. С. Гистерезисные эффекты сокращения изолированного мышечного волокна при модулированной стимуляции в изометрическом режиме. *Физика живого*. 2007. Т.15, № 2. С. 84 – 88.
28. Huxley H. The mechanism of muscular contraction. *Science*. 1969. Vol. 164, № 3886. P. 1356 – 1366.
29. McNally E. Skeletal Musculus Structure and Function. *Principles of Molecular Medicine*. 2006. P. 674-681.
30. Ноздренко Д. М., Мотузюк О.П., Заводовский Д.О., Срепанюк Я. В. Ультраструктурні зміни міофібрил у людини при ішемічній контрактурі. *Науковий вісник Волинського національного університету імені Лесі Українки*. 2012. № 2. С. 89 – 92.
31. Luther P. The vertebrate musculus Z-disc: sarcomere anchor for structure and signaling. *J Musculus Res Cell Motil*. 2009. Vol. 30. P. 171–185.
32. Segal S. Neural control of musculus blood flow during exercise. *J Appl Physiol*. 2004. Vol. 97. P. 731-738.
33. Georgopoulos A. Current issues in directional motor control. *Trends Neurosci*. 1995. Vol.18. P. 506–510.
34. Pellionisz A. Tensorial approach to the geometry of brain function: cerebellar coordination via a metric tensor. *Neuroscience*. 1985. Vol. 5. P. 1125–1136.

35. Basmajian C. Deluca Musculus alive. Their functions revealed by electromyography. Williams and Wilkins. 1985. Vol. 10. P. 461- 467.
36. Lacquaniti F. Representing spatial information for limb movement: role of area 5 in the monkey. *Cereb Cortex*. 1995. Vol. 5. P. 391–409.
37. Koll M., Ahmed S., Mantle D., Donohue T. M., Palmer T. N. Simanowski U. A., Seltz H. K., Peters T. J., Preedy V. R. Effect of acute and chronic alcohol treatment and their superimposition on lysosomal, cytoplasmic, and proteosomal protease activities in rat skeletal musculus in vivo. *Metabolism*. 2002. Vol. 51. I. 1. P. 97 -104.
38. Preedy V. R., Adachi J., Veno G. Alcoholic skeletal musculus myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur. J. Neurol*. 2001. Vol. 8. I. 6. P. 677 – 687.
39. Неврологические аспекты алкоголизма. Методические разработки по неврологии для студентов лечебного и медико-биологического факультетов. Под ред. проф. Л.Г. Ерохиной. М., 2-й МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова. 1998 36с.
40. Pruznak A.M., Nystrom J., Lang C.H. Direct central nervous system effect of alcohol alters synthesis and degradation of skeletal musculus protein. *Alcohol*. 2013. 48. P. 138-145.
41. Пауков В. С., Беляева Н. Ю., Воронина Т. М. Алкоголизм и алкогольная болезнь. *Терапевтический архив*. 2001. Т. 73. № 2. С. 65 - 67.
42. Preedy V. R., Peters T. J., Patel V. B., and Miell J. P. Chronic alcoholic myopathy: transcription and translational alterations. *The FASEB J*. 1994. Vol. 8. P. 1146 - 1151.
43. Preedy V.R., Adachi J., Veno G. Alcoholic skeletal musculus myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur. J. Neurol*. 2001. Vol. 8. N 6. P. 677-687.

44. Steiner J.L., Lang C. H. Dysregulation of skeletal musculus protein metabolism by alcohol. *AJP Endocrinology and Metabolism*. 2015. Vol. 308. I. 9. P. 699 - 712.
45. Hong-Brown L.Q., Frost R.A., Lang C.H. Alcohol impairs protein synthesis and degradation in cultured skeletal musculus cells. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2001, 25: 1373-1382.
46. Worrall S., Niemela O., Parkkila S., Peters T. J., Preedy V. R.: Protein adducts in type I and type II fibre predominant musculus of the ethanol-fed rat: preferential localisation in the sarcolemmal and subsarcolemmal region. *Eur. J. Clin. Invest.* 2001. Vol. 31, 723 - 730.
47. Lang C. H., Frost R. A., Vary T. C. Skeletal musculus protein synthesis and degradation exhibit sexual dimorphism after chronic alcohol consumption but not acute intoxication. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. Vol. 292.–I. 6. P. 1497 - 506.
48. Durán-Castellón, M. C., González-Reimers, E., López-Lirola, A., Oliver, R., Santolaria-Fernandez, F., Galindo-Martín, L., Abreu-Gonzalez, P., Gonzalez-Hernandez, T. Alcoholic myopathy: lack of effect of zinc supplementation. *Food Chemical Toxicol.* 2005, 43 (9), pp 1333-1343.
49. Oba T., Koshita M., Yamaguchi M. H₂O₂ modulates twitch tension and increases P_o of Ca²⁺-release channel in frog skeletal musculus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1996. Vol. 271. P. 810 - 818.
50. Aberle N. S., Ren J. Short-term acetaldehyde exposure depresses ventricular myocyte contraction: role of cytochrome P₄₅₀ oxidase, xanthine oxidase, and lipid peroxidation. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2003. Vol. 27. P. 577 - 583.
51. Fernandez-Sola J., Lluís M., Sacanella E., Estruch R., Antunez E., Urbano-Marquez A. Increased myostatin activity and decreased myocyte proliferation

in chronic alcoholic cardiomyopathy. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2011. Vol. 35. P. 1220 - 1229.

52. Mendelson J. H., Mello N. K., Ellingboe J. Effects of acute alcohol intake on pituitary-gonadal hormones in normal human males. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977. Vol. 202. P. 676 - 682.

53. Widenius T. V., Eriksson C. J., Ylikahri R. H., Harkonen M. Inhibition of testosterone synthesis by ethanol: role of luteinizing hormone. *Alcohol.* 1989. Vol. 6. P. 241- 244.

54. Cicero T. J., Bell R. D., Meyer E. R., Badger T. M. Ethanol and acetaldehyde directly inhibit testicular steroidogenesis. *J. Pharmacol. Exp.* 1980. Vol. 213. P. 228 - 233.

55. Зай С. Ю., Мотузюк О. П., Білобров В. Ю., Вулицька Д. А., Ноздренко О. Д., Абрамчук О. М. Зміни силової відповіді musculus soleus у алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 та 2 години. *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія" Біологія".* 2017, 29 (2). с. 82-88.

56. Preedy V. R., Salisbury J. R., Peters T. J. Alcoholic musculus disease: features and mechanisms. *J. Pathol.* 1994, 173 (4), pp. 309-315.

57. Vary T. C., Lang C. H. Assessing effects of alcohol consumption on protein synthesis in striated musculus. *Methods Mol. Biol.* 2008, 447. pp. 343-355.

58. Motuziuk O., Nozdrenko D., Prylutska S., Bogutska K., Korotkyi O., Prylutsky Yu. Biochemical parameters of blood and tissue of the gastrocnemius Musculus in chronically alcoholized rats under oral administration of C₆₀ fullerene aqueous solution. *Ukr Biochem J.* 2023, 95(2). Pp. 58-67.

59. Motuziuk O., Nozdrenko D., Prylutska S., Vareniuk I., Bogutska K., Braniuk S., Korotkyi O., Prylutsky Yu., Ritter U., Piosik J. The effect of C₆₀ fullerene

on the mechanokinetics of musculus gastrocnemius contraction in chronically alcoholized rats. *Heliyon*. 2023, 9(8): e18745.

60. Adachi J., Asaano M., Ueno Y., Niemela O., Ohlendieck K., Peters T. J., Preedy V. R. Alcoholic musculus disease and biomembrane perturbations(review). *J Nutr Biochem*. 2003. Vol. 14. P. 616 - 625.

61. Vary T. C., Nairn A. C., Lang C. H. Restoration of protein synthesis in heart and skeletal musculus after withdrawal of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004, 28 (4), pp. 517-525.

62. Hunter R. J., Neagoe C., Järveläinen H. A., Martin C. R., Lindros K. O., Linke W. A., Preedy V. R. Alcohol affects the skeletal musculus proteins, titin and nebulin in male and female rats. *J. Nutr*. 2003, 133 (4), p. 1154 -1157.

63. Adachi J., Asano M., Ueno Y., Niemelä O., Ohlendieck K., Peters T. J., Preedy V. R. Alcoholic musculus disease and biomembrane perturbations. *J. Nutr. Biochem*. 2003, 14 (11), pp. 616-625.

64. Preedy V. R., Patel V. B., Reilly M. E., Richardson P. J., Falkous G., Mantle D. Oxidants, antioxidants and alcohol: implications for skeletal and cardiac musculus. *Front Biosci*. 1999, 4, pp 58-66.

65. Sharma S. C., Ray R. C., Banerjee A. K., Lakshmanan C. Chronic musculus wasting in alcoholics – a histochemical and biochemical study. *Indian J Pathol Microbiol*. 1990, 33 (3), pp 244-249.

66. Hanid A., Slavin G., Muir W., et al. Fibre type changes in striated musculus of alcoholics. *J. Clin. Pathol*. 1981. Vol. 34. pp 991 - 955.

67. Arya M. A., Tai A. K., Wooten E. C., Parkin C. D., Kudravtseva E., Huggins G. S. Notch pathway activation contributes to inhibition of C2C12 myoblast differentiation by ethanol. *PLoS One*. 2013 Aug 20,8(8):e71632.

68. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 2004. vol. 142, 2, p. 231–255,
69. Cederbaum A.I. Introduction - Serial review: Alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001, 31(12). Pp 1524–1526,
70. Fernández-Solà J., Preedy V.R., Lang C.H., et al. Molecular and cellular events in alcohol-induced musculus disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2007, 31(12). Pp 1953–1962.
71. Bianco A., Thomas E., Pomara F., Tabacchi G., Karsten B., Paoli A., Palma A. Retracted: Alcohol consumption and hormonal alterations related to musculus hypertrophy: a review. *Nutrition & Metabolism*. 2014. Vol. 11. I. 26. P. 2 - 8.
72. Otis J.S., Brown L.A., Guidot D.M. Oxidant-induced atrogen-1 and transforming growth factor-beta1 precede alcohol-related myopathy in rats. *Musculus & Nerve*. 2007. 36(6). Pp. 842–848.
73. Dekeyser G.J., Clary C.R., Otis J.S. Chronic alcohol ingestion delays skeletal musculus regeneration following injury. *Regenerative Medicine Research*. 2013. 1(1):2, pp. 211-218.
74. Gomes-Marcondes M.C., Tisdale M.J. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Letters*. 2002. 180(1). Pp. 69– 74.
75. Dong R. Water-Soluble C60 Protects Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Int J Nanomedicine*. 2020, 31(15). Pp. 2269-2276.
76. Koll M., Ahmed S., Mantle D., Donohue T. M., Palmer T. N., Simanowski U. A., Seltz H. K., Peters T. J., Preedy V. R. Effect of acute and chronic alcohol treatment and their superimposition on lysosomal, cytoplasmic, and

proteosomal protease activities in rat skeletal musculus in vivo. *Metabolism*. 2002. 51 (1), p 97-104.

77. Fernandez-Sola J., Preedy V.R., Lang C.H. et al. Molecular and cellular events in alcohol-induced musculus disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007. 31(12). Pp. 1953-1962.

78. Estruch R., Nicolas J.M., Villegas E., Junque A., Urbano-Marquez A. Relationship between ethanol-related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men. *Alcohol Alcohol*. 1993, 28. Pp. 543-550.

79. Parr E. B., Camera D. M., Areta J. L., Burke L. M., Phillips S. M., Hawley J. A., Coffey V. G. Alcohol ingestion impairs maximal post-exercise rates of my-ofibrillar protein synthesis following a single bout of concurrent training. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. P. 883 - 884.

80. Duane P., Peters, T. J. Nutritional status in alcoholics with or without skeletal musculus myopathy. *Alcohol and Alcoholism*. 1988. Vol. 23. P. 271 - 277.

81. Sacanella E., Fernandez-Sola J., Cofan M. et al. Chronic alcoholic myopathy: diagnostic clues and relationship with other ethanol-related diseases. *QJM*. 1995. Vol. 88. I. 11. P. 811- 817.

82. González-Reimers E., Durán-Castellón M. C., López-Lirola A., Santolaria-Fernández F., Abreu-González P., Alvisa-Negrín J., Sánchez-Pérez M. J. Alcoholic myopathy: vitamin D deficiency is related to musculus fibre atrophy in a murine model. *Alcohol and Alcoholism*. 2010. Vol. 45. I. 3 P. 223 - 230.

83. Haller R. G. Experimental acute alcoholic myopathy – a histochemical study. *Muscle & Nerve*. 1985. Vol. 8. I. 3. P. 195 - 203.

84. Wilson S. R. Biological aspects of fullerenes. *Fullerenes: Chemistry, Physics and Technology*. New York: John Wiley & Sons. 2000, p. 437–465.

85. Матишевська О. П., Прилуцька С. В., Гринюк І. І. Фулерени C₆₀ – біологічно активні молекули. І. Фізико-хімічні властивості та біодоступність. *Біотехнологія*. 2010. 3 (1), с. 18–26.
86. Vavrova J., Řezačova M., Pejchal J. Fullerene nanoparticles and their anti-oxidative effects: a comparison to other radioprotective agents. *J. Appl. Biomed.* 2012. 10, p 1–8.
87. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L., Dmytruk I. M., Bilyi M. M., Golub O. A., Khavryuchenko A. V., Buzaneva E. V., Aksenov V. L., Avdeev M. V. Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data. *Carbon*. 2004. 42, p 1203–1206.
88. Youle R. J., Karbowski, M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. 6 (8), p 657-663.
89. Zhang B et al. Delineating oxidative processes of aqueous C₆₀ preparations: role of THF peroxide. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, pp. 108–13.
90. Tsai M. C., Chen Y. H., Chiang L. Y. Polyhydroxylated C₆₀, fulleranol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 1997. 49 (4), p 438-445.
91. Lotharius J., Dugan L. L., O'Malley K. L. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 1999. 19 (4), p 1284-1293.
92. Katsamenis O. L., Bouropoulos N, Fatouros D. G. Interaction of fullerenes C₆₀ with large unilamellar vesicles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2009. 5, p 416–420.
93. Bedrov, D., Smith, G. D., Davande, H., Li, L. Passive transport of C₆₀ fullerenes through a lipid membrane: a molecular dynamics simulation study. *J. Phys. Chem.* 2008. 112, p 2078–2084.

94. Prylutska S., Bilyy R., Overchuk M., Bychko A., Andreichenko K., Stoika R., Rybalchenko V., Prylutsky Y., Tsierkezos N. G., Ritter U. Water-soluble pristine fullerenes C₆₀ increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2012, 8, 30, p 522–527.
95. Injac R., Prijatelj M., Strukelj B. Fullerenol nanoparticles: toxicity and antioxidant activity. *Methods Mol Biol.* 2013. 1028, p 75-100.
96. Chirico F., Fumelli C., Marconi A., Tinari A., Straface E., Malorni W., Pellicciari R., Pincelli C. Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway. *Exp Dermatol.* 2007. 16 (5), p 429-436.
97. Baierl T., Seidel A. In vitro effects of fullerene C₆₀ and fullerene black on immunofunctions of macrophages. *Full Sci Technol.* 1996. p 1073-1085.
98. Ryan J.J., Bateman H.R., Stover A., Gomez G. et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol.* 2007. 179(1). Pp. 665-72.
99. Nozdrenko D.M., T.Yu. Matvienko, O.V. Vygovska, P.Yu. Drozd, Yu.I. Prylutsky. The change in the biochemical parameters of the rat blood after skeletal musculus injury with C₆₀ fullerene injection. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii.* 2020. 18(3). Pp. 449–458.
100. Nozdrenko D.M., Bogutska K.I., I.V. Pampukha, Yu.I. Prylutsky. Development of slow and rapid fatigue of rat skeletal musculus at the intramuscular injection of water-soluble C₆₀ fullerenes. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii.* 2021. 19(3). Pp. 759–766.
101. Johnston, H. J., Hutchison, G. R., Christensen, F. M., Aschberger, K., Stone, V. The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity. *Toxicol. Sci.* 2010. 114 (2), p 162–182.

102. Rouse J. G., Yang J., Monteiro Reviere N. A. Barton A. R. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. in vitro*. 2006. 20, p 1313–1320.
103. Ashcroft J.M. Fullerene C₆₀ immunoconjugates: interaction of water-soluble C₆₀ derivatives with the murine anti-gp240 melanoma antibody. *Chem Commun*. 2006. 28. Pp. 3004-6.
104. Romero J.C., Santolaria-Fernandez F., Gonzalez-Reimers E., Diaz-Flores .L, Conde A., Rodriguez-Moreno F., Batista N. Chronic alcoholic myopathy and nutritional status. *Alcohol*. 1994.11. Pp. 549–555.
105. M.C. Durán Castellón, E. González-Reimers, A. López-Lirola, R. Martín Olivera, F. Santolaria-Fernández, L. Galindo-Martín, P. Abreu-González, T. González-Hernández,. Alcoholic myopathy: lack of effect of zinc supplementation. *Food Chemical Toxicol*. 2005. 43. Pp. 1333–1343.
106. Ramm G.A., Ruddell R.G. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 2005. 25. Pp. 433–439.
107. Ward R.J., Peters T.J. The antioxidant status of patients with either alcohol-induced liver damage or myopathy. *Alcohol Alcohol*. 1992. 27. Pp. 359–365.
108. Fernández-Solà J., Villegas E., Nicolas J. M., Deulofeu R., Antunez E., Sacanella E., ... & Urbano-Márquez A. Serum and Muscle Levels of α -Tocopherol, Ascorbic Acid, and Retinol Are Normal in Chronic Alcoholic Myopathy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1998. 22(2). Pp. 422-427.
109. Fernández-Solà J., García G, Elena M., Tobías E., Sacanella E., Estruch R., Nicolas J.M. Musculus antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002. 26. Pp. 1858–1862.

110. Levitt D. E., Molina P. E., Simon L. Pathophysiological mechanisms of alcoholic myopathy - Lessons from rodent models. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2021.52 (2). Pp. 107-116.
111. Trounce I., Byrne E. and Dennett X. Biochemical and morphological studies of skeletal musculus in experimental chronic alcoholic myopathy. *Acta Neurol. Scand.* 1990. 82. Pp. 386-391.
112. Trounce I., Byrne E., Dennett X., Santamaria J., Doery J. and Peppard R. Chronic alcoholic proximal wasting: physiological, morphological and biochemical studies in skeletal musculus. *Aust. NZJ Med.* 1987. 17. Pp. 413-419.
113. Ferrando L., Voces A., J., de Oliveira, C.C., Prieto, J.G. and Alvarez, A.I. Efect of chronic ethanol ingestion and exercise training on skeletal musculus in rat. *Drug Alcohol Depend.* 2001. 64. Pp. 27-33.
114. Constanza Caceres-Ayala, Ricardo M. Pautassi, Магна Josñ Acuca, Waldo Cerpa & Daniela L. Rebolledo. The functional and molecular effects of problematic alcohol consumption on skeletal musculus: a focus on athletic performanc. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*. 2022. 48. Pp. 2, 133-147.
115. Heikkonen E., Ylikahri R., Roine R., Valimaki M., Harkonen M., Salaspuro M. Efect of alcohol on exercise-induced changes in serum glucose and serum free fatty acids. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998. 22. Pp. 437-43.
116. Siler S.Q., Neese R.A., Christiansen M.P., Hellerstein M.K. The inhibition of gluconeogenesis following alcohol in humans. *Am J Physiol.* 1998. 275. Pp. 897-907.
117. Jorfeldt L., Juhlin-Dannfelt A. The in'uence of ethanol on splanchnic and skeletal musculus metabolism in man. *Metabolism.* 1978. 27. Pp. 97-106.
118. Cardellach F., Taraschi T.F., Ellingson J.S., Stubbs C.D., Rubin E., Hoek J.B. *Biochem J.* 1991. 274. Pp. 565-73.

119. Cardellach F., Galofre J., Grau J. M., Casademont J., Hoek J. B., Rubin E., Urbano-Márquez A. Oxidative metabolism in musculus mitochondria from patients with chronic alcoholism. *Ann Neurol.* 1992. 31. Pp. 515–18.

120. Kumar A., Davuluri G., Welch N., Kim A., Gangadhariah M., Allawy A., Priyadarshini A., McMullen M.R., Sandler Y., Willard B., et al. Oxidative stress mediates ethanol-induced skeletal musculus mitochondrial dysfunction and dysregulated protein synthesis and autophagy. *Free Radic Biol Med.* 2019.145. Pp. 284–99.

121. Mikheev I.V., Sozarukova M.M., Izmailov D.Y., Kareev I.E., Proskurnina E.V., Proskurnin M.A. Antioxidant Potential of Aqueous Dispersions of Fullerenes. *Int J Mol Sci.* 2021, 22 (11). Pp. 5838.

122. Otis J.S., Guidot D.M. Procysteine increases alcohol-depleted glutathione stores in rat plantaris following a period of abstinence. *Alcohol Alcohol.* 2010. 45. Pp. 495–500.

123. Prylutsky Y., Nozdrenko D., Gonchar O., Prylutska S., Bogutska K., Franskevych D., ... Ritter U. Fullerene attenuates musculus force reduction in a rat during fatigue development. *Heliyon.* 2022, 8 (12). Pp. e12449

124. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg, 1986.

125. Закон України “Про захист тварин від жорстокого поводження”. №. Пp. 3446-IV від. 21 лютого 2006 p. URL. Пp. <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>

126. Закон України. “Про відходи”. № 187/98 від 5 березня 1998 p. URL:<http://sfs.gov.ua/zakonodavstvo/podatkove-zakono-davstvo/normativno-pravovi-akti-zpitankpr/zakoniukraini/61760.html>

127. Пархоменко Ю. М., Донченко Г. В., Пилипчук С. Ю., Степаненко С. П., Чеховская Л. И., Клименко Е. П. Характерные метаболические нарушения

в тканях крыс, вызванные длительным приемом алкоголя. *Укр. біохім. журн.* 2007. 79 (3), с 61- 69.

128. Халилов М. Х., Закихорджаев Ш. Я. К характеристике некоторых патохимических сдвигов в крови, тканях печени и головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации, Вопросы клиники алкоголизма: Сб. науч. тр., Ташкент, 1983. с 38-41.

129. Collins M.A., Neafsey, E.J. Alcohol, excitotoxicity and adult brain damage: an experimentally unproven chain-of-events. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2016. 9, p 8-18.

130. Song K., Coleman R.A., Xiaoyan Z., Alber C., Ballas Z.K., Waldschmidt T.J. Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *Journal of Leukocyte Biology.* 2002. 72, pp. 1109–1116.

131. D'Souza El-Guindy N.B., Kovacs E.J., De Witte P., Spies C., Littleton J.M., De Villiers W.J.S. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. *Alcoholism: clinical and experimental research.* 2010. 34, pp. 1489–1511.

132. Ноздрачев А. Д., Поляков, Е. Л. Анатомия крысы. Лабораторные животные. СПб, 2001, 464 с.

133. Molina P.E., Gardner J.D., Souza-Smith F.M., and Whitaker A.M. Alcohol abuse: Critical pathophysiological processes and contribution to disease burden. *Physiology (Bethesda).* 29(3). Pp. 203–215, 2014. PMID: 24789985

134. Ritter U., Prylutskyu Yu. I., Evstigneev M. P., Davidenko N. A., Cherepanov V. V., Senenko A. I., Marchenko O. A., Naumovets A. G. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* 2015. 23 (6), p 530-534.

135. Qiao R., Roberts A. P., Mount A. S., Klaine S. J., Ke P. C. Translocation of C₆₀ and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Lett.* 2007. 7 (3), p 614–619.
136. Gharbi N., Pressac M., Hadchoue, M., Szwarc H., Wilson S. R., Moussa F. C₆₀ fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.* 2005. 5 (12), p 2578-2585.
137. Urbano-Márquez A., Fernández-Solà J. Effects of alcohol on skeletal and cardiac musculus. *Musculus & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine.* 2004. 30 (6), pp. 689–707.
138. Zhang, X.Li SY, Brown RA, and Ren J. Ethanol and acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy: from bad to ugly en route to oxidative stress. *Alcohol.* 2004. 32, 175–186.
139. Nozdrenko D. M., Zay S. Yu., Motuziuk O. P., Bogutska K. I., A. V. Ilchenko, Prylutsky Yu. I. Influence of C₆₀ Fullerenes on the Mechanokinetic and Biochemical Parameters of Musculus Soleus Contraction in Chronically Alcoholised Rats with Experimentally-Induced Ischemia. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii.* 2018. 16 (3). P. 0585–0597
140. Bohutska K.I., Prylutsky Yu.I., Nozdrenko D.M. The use of aluminum and its compounds for the biomedical purposes. *Fiziol Zh.* 2014.60(1). Pp. 91-7.
141. Nozdrenko D. M., Matvienko T. Yu., K. I. Bogutska, O. Yu. Artemenko, O. V. Ilchenko, Prylutsky Yu. I. Applying C60 Fullerenes Improve the Physiological State of Rats with Ischemia–Reperfusion Injury of Skeletal Musculus. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii.* 2019. 17, 3, P 409-423
142. Cofan M., Nicolas J. M., Fernandez-Sola J., Robert J., Tobias E., Sacanella E, Estruch R et al. Acute ethanol treatment decreases intracellular calcium-ion transients in mouse single skeletal musculus fibres in vitro. *Alcohol Alcohol.* 2000. Vol. 35. P. 134 - 138.

143. Suzuki K., Ohno H., Ohishi S., Kizaki T., Ookawara T., Fukii J., Radak A., Taniguchi N. Superoxide dismutases in exercise and disease. In: Sen, CK., Packer, L., Hanninen, O., Handbook of oxidants and antioxidants and exercise. Elsevier, Amsterdam. 2000. p. 243-295.
144. Lejay A., Charles A. L., Zoll J., Bouitbir J., Thaveau F., Piquard F., Geny B. Skeletal muscle mitochondrial function in peripheral arterial disease: usefulness of muscle biopsy. *Musculus Biopsy*. 2012. p. 133–154.
145. Prylutska S.V., Grebinyk A.G., Lynchak O.V., Byelinska I.V., Cherepanov V.V., Tauscher E., Matyshevska O.P., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko, V.K., Ritter U., Frohme M. In vitro and in vivo toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.* 2019. 27, P. 715.
146. Brand M. D., Affourtit C., Esteves T. C., Green K., Lambert A. J., Miwa S., Pakay J. L., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 2004. 37 (6), pp 755-767.
147. Ji L.L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008. 44. Pp. 142–152.
148. Kimball S.R., Lang C.H. Mechanisms Underlying Muscle Protein Imbalance Induced by Alcohol. *Annu Rev Nutr.* 2018. 38. Pp. 197–217.
149. Steiner J.L., Lang C.H. Alcohol impairs skeletal muscle protein synthesis and mTOR signaling in a time-dependent manner following electrically stimulated muscle contraction. *J Appl Physiol.* 2018. 117. Pp. 1170–1179.
150. Lang C.H., Wu D., Frost R.A., Jefferson L.S., Kimball S.R., Vary T.C. Inhibition of muscle protein synthesis by alcohol is associated with modulation of eIF2B and eIF4E. 1999. *Am J Physiol* 277. Pp. E268–276.
151. Shenkman B.S., Zinovyeva O.E., Belova S.P., Mirzoev T.M., Vilchinskaya N.A., Vikhlyantsev I.M., Ulanova A.D., Turtikova O.V., Samkhaeva N.D., Parfenov V.A., Barinov A.N., Nemirovskaya T.L. Cellular and molecular signatures of alcohol-

induced myopathy in women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019. 316. Pp. E967–E976.

152 Crowell K.T., Laufenberg L.J., Lang CH. Chronic Alcohol Consumption, but not Acute Intoxication, Decreases In Vitro Skeletal Muscle Contractile Function. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019, 43 (10). Pp. 2090-2099.

153. Nemirovskaya T.L., Shenkman B.S., Zinovyeva O.E., Kazantseva Y.N., Samkhaeva ND. Development of clinical and morphological signs of chronic alcoholic myopathy in men with prolonged alcohol intoxication. *Human physiology.* 2015,41. Pp. 625-628.

154. Reilly M.E., McKoy G., Mantle D., Peters T.J., Goldspink G., Preedy V.R. Protein and mRNA levels of the myosin heavy chain isoforms Ibeta, IIa, IIx and IIb in type I and type II fibre-predominant rat skeletal muscles in response to chronic alcohol feeding. *Journal of muscle research and cell motility.* 2000. 21. Pp. 763–73.

155. Fernandez - Sola J., Sacanella E., Estruch R., Nicolas J.M., Grau J.M., Urbano Marques A. Significance of type II fiber atrophy in chronic alcoholic myopathy. *J Neurol Sci.* 1995,130(1). Pp. 69-76.