

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В MUSCULUS GASTROCNEMIUS ЩУРА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВИКЛИКАНІЙ ІШЕМІЇ РІЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ВОДНОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ C₆₀-ФУЛЛЕРЕНІВ

Мельничук Д.М.

*Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки
(Луцьк)*

Науковий керівник – Мотузюк О.П., кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології людини і тварин Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки

При дії на скелетні м'язи різних ушкоджуючи факторів може розвиватися ряд паталогій, серед яких ішемічні ушкодження становлять понад 35% від загальної кількості пошкоджень опорно-рухового апарату. У більшості випадків вони є основними причинами ускладнень післяопераційного періоду та після гострої артеріальної оклюзії можуть призвести до ампутації кінцівок і навіть смертності. Ішемія викликає тяжкі морфофункціональні зміни м'язів на рівні окремих клітин, що супроводжується дистрофією м'язових волокон. Безпосереднім наслідком ішемічного ушкодження м'яза є зменшення його максимальної силової відповіді, швидкісно-силових характеристик, а також пришвидшення виникнення та розвитку втоми.

У процесі розвитку ішемічно-реперфузних ушкоджень м'язової тканини основну патогенну роль відіграють вільні радикали, а саме супероксид-аніон і гідроксид-радикал. Вони ініціюють перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), інгібують мітохондріальні ферменти дихального ланцюга та АТФ-азну активність, інактивують гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу, мембранні натрієві канали, тощо. Активні форми кисню (АФК) відіграють ключову роль у запуску біохімічного каскаду індукції апоптозу клітини та, поєднуючись між собою, здатні викликати значні токсичні ураження. Використання речовин, молекули яких здатні адсорбувати супероксидний аніон-радикал та гідроксид-радикал, захищає білки, ліпіди і ДНК від ушкоджень, перешкоджаючи запрограмованій смерті клітин.

Сьогодні значну зацікавленість викликає нова алотропна модифікація – C₆₀ фулерени, яким притаманні унікальні фізико-хімічні властивості та біологічна активність. Завдяки майже сферичній формі, нанорозміру та гідрофобним властивостям молекула C₆₀ здатна проникати через клітинні мембрани та локалізуватись всередині клітини, а завдяки наявності кон'югованої системи подвійних міжвуглецевих зв'язків – взаємодіяти з вільними радикалами та нейтралізувати їх.

Беручи до уваги, що АФК зумовлюють значний деструктивний вплив на скелетні м'язи за умов ішемічного ушкодження, то застосування C₆₀ фулеренів зможе суттєво підвищити стійкість м'яза до даного паталогічного чинника та пришвидшити період відновлення. Дослідження цитотоксичності C₆₀ фулеренів

показали, що принаймні за низьких (фізіологічних) концентрацій вони не виявляють токсичних ефектів щодо нормальних клітин, є неімуногенними та неалергенними, а додатково здатні захищати клітини (наприклад, нейрони, клітини гепатоми, епітеліальні клітини) від різних токсинів.

Отже, враховуючи виражені антиоксидантні властивості C_{60} фулеренів та відсутність даних про викликані ними гострі та хронічні інтоксикації, важливим є дослідження їх як потенційних агентів для корекції паталогічних змін м'язової тканини, які спричинені дією вільнорадикальних процесів.

Мета і завдання дослідження – дослідити вплив водного розчину C_{60} фулеренів на морфологічні зміни м'язових волокон литкового м'яза щурів за умови експериментально-індукованої ішемії різної тривалості.

Для досягнення поставленої мети до завдань дослідження входило: з'ясувати морфологічні особливості поперечно-посмугової м'язової тканини залежно від тривалості ішемії за допомогою світлової мікроскопії; проаналізувати гістологічні особливості м'язових волокон литкового м'яза щура за умов ішемії різної тривалості та внутрішньочеревного введення водного колоїдного розчину C_{60} фулеренів; показати можливий протекторний вплив C_{60} фулеренів як поглиначів вільних радикалів у ішемізованих м'язах.

Дослідження проводились на 24 статевозрілих самцях білих щурів лінії *Wistar*. Досліджувані щурі були поділені на 3 групи: контроль-I (n=3) – нативний *m.gastrocnemius*, контроль-II (n=3) – *m.gastrocnemius* за умови внутрішньочеревного введення водного колоїдного розчину C_{60} фулеренів упродовж 5 днів, та експериментальну (n=18). В свою чергу експериментальна група була розділена на 6 підгруп (по 3 тварин у кожній) із експериментально-індукованою унілатеральною васкулярною ішемією м'язів задніх кінцівок тривалістю 1, 2 та 3 години та тварини з індукованою унілатеральною васкулярною ішемією м'язів задніх кінцівок тривалістю 1, 2 та 3 години за умов застосування C_{60} фулеренів. Протокол експерименту був затверджений комісією з питань біоетики СНУ імені Лесі Українки відповідно до правил «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). *Водний колоїдний розчин C_{60} фулеренів* (концентрація 0,15 мг/мл) – доза 1 мг/кг – вводили ентерогастрально протягом 5 днів.

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

Гістологічна підготовка та фарбування зрізів. Досліджувані зразки м'язів фіксували в 10% формаліні, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, заливку матеріалу проводили в гомогенізовану парафінову суміш фірми «Histomix». Різання блоків проводили серійно поздовж та впоперек волокон на санному мікротомі (МС-2) товщиною 10 та 15 мкм. Фарбування м'язової тканини виконували за методом Ван-Гізон (гематоксилін Майєра, пікрофуксин) та поміщали в полістерол. Препарати розглядали під мікроскопом

із загальним збільшенням у 100 та 400 разів. Фотографували за допомогою цифрової камери SEO на мікроскопі Axioskop-40 (Carl Zeiss). Морфометричні показники (товщину м'язового волокна та величину міжфібрилярного простору) вимірювали за допомогою програми «ВідеоТест Морфологія 5.0».

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

Отже, за умов ішемії тривалістю 1 год., м'язові волокна вже зазнають незначних деструктивних змін. На цьому етапі можна спостерігати набряк ендомізію, початкові зміни сарколеми, утворення на ній малопомітних хвилеподібних випинів та впячувань, а у деяких випадках зареєстровано гіпертрофію м'язових волокон. При застосуванні C_{60} фулеренів при ішемії 1 год. відмічаємо їх виражений захисний вплив. М'язові волокна проявляють стійкість до дії ішемії їх морфометричні показники не відрізняються від норми.

При 2-х год. ішемії у м'язових волокнах литкового м'яса починає збільшуватись кількість фібробластів та їх активність, що спричинює збільшення сполучної тканини, та заміщення нею м'язових волокон. Відбувається початкове руйнування скоротливого апарату, сарколема набуває хвилеподібного вигляду. Спостерігають початкові прояви некрозу тканин. Застосування C_{60} фулеренів за ішемії тривалістю 2 год., не чинить такої антиоксидантної дії як при 1 год. ішемії, спостерігаються волокна нерівномірної товщини, набряк ендомізію, порушення цілісності сарколеми. Однак, ці зміни є менш вираженими, ніж за умов звичайної ішемії.

При 3-х год. ішемії, можемо спостерігати прогресуючий некроз, поглиблення попередніх паталогічних змін, деструкцію скоротливого апарату міофібрил та зникнення поперечної посмугованості. Проте, на різних ділянках ці зміни виражені не рівномірно. Дія C_{60} фулеренів за даних умов практично не чинить свій антиоксидантний ефект. Спостерігаються ознаки некротичного переродження, втрата поперечної посмугованості та сепарація волокон. Та все ж у порівнянні з ішемізованим м'язом, використання C_{60} фулеренів зумовлювало збільшення товщини м'язових волокон та зменшення міжфібрилярного простору.

C_{60} фулерени найкраще проявляють антиоксидантні властивості за ішемії тривалістю одна година, зі збільшенням ж тривалості ішемічного ураження відбувається зниження їхньої дії та стійкості м'язового волокна до викликаних змін, що може бути пов'язано з накопиченням великої кількості вільних радикалів. Однак, навіть за ішемії тривалістю три години, морфометричні показники були більш наближені до показників норми ніж за умов звичайної ішемії.