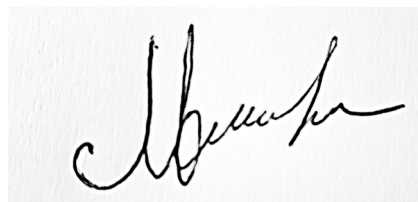


КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

МОТУЗІЮК ОЛЕКСАНДР ПЕТРОВИЧ



УДК 612.741.1:616.748-092:615.015.2:547.279

**Скоротлива активність скелетних м'язів за хронічної алкогольної
міопатії та її корекція водорозчинними C₆₀ фулеренами**

03.00.02 - біофізика

РЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

КИЇВ – 2026

Дисертацією є наукова доповідь (за сукупністю статей). Робота виконана на кафедрі біофізики та нейробіології ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України.

Науковий консультант: доктор фізико-математичних наук, професор
Прилуцький Юрій Іванович,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України,
професор кафедри біофізики та нейробіології
ННЦ «Інститут біології та медицини».

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, академік НАН України,
професор **Костерін Сергій Олексійович**,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу біохімії м'язів,
заступник директора з наукової роботи;

доктор біологічних наук, професор
Бабський Андрій Мирославович,
Львівський національний університет
імені Івана Франка МОН України,
завідувач кафедри біофізики та
біоінформатики;

доктор біологічних наук, член-кореспондент
НАН України, професор
Ємець Алла Іванівна,
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України», завідувач відділу клітинної біології
та біотехнології.

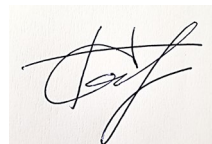
Захист відбудеться 22 червня 2026 р. о 14:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за
адресою: вул. Володимирська 60, ауд. 202 головного корпусу із використанням
засобів відеозв'язку в режимі реального часу за посиланням:

<https://knu-ua.zoom.us/j/81465388581?pwd=jN4OKmnnZaORSyJKzWTh7fh1SFvc6P.1>

Ідентифікатор конференції: 814 6538 8581, Код доступу: 035455

З дисертацією можна ознайомитися на офіційному сайті Науково-консультаційного
центру <http://scc.knu.ua> та в Науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського
національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул.
Володимирська, 58, к. 12.

Вчений секретар спеціалізованої вченої
ради Д 26.001.24



Наталія РАКША

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність дослідження. Хронічний алкоголізм - захворювання, що характеризується синдромом алкогольної залежності, внаслідок якого настають специфічні соматичні, міопатичні та нервові розлади. Смертність від алкоголізму та пов'язаних з ним супутніх захворювань посідає третє місце у світі, поступаючись лише смертності від серцево-судинних захворювань і злоякісних новоутворень [Volkow, et al., 2021]. Згідно даних ВООЗ внаслідок вживання алкоголю щорічно помирає понад 3 мільйона осіб, серед яких молоді люди віком 20-40 років складають близько 25% [Rehm, et al., 2009]. Алкогольну міопатію розглядають як самостійну патологічну форму, яка розвивається незалежно від інших проявів алкогольної хвороби, таких як ураження печінки, серцевого м'яза або алкогольної поліневропатії [Predy, et al., 2001]. Розрізняють кілька клінічних форм алкогольної міопатії, що розвиваються на тлі інтоксикації алкоголем та об'єднуються єдиним терміном – «алкоголь-індуковане ураження м'язів» [Fernández-Solà, et al., 1996]. Найпоширенішою формою алкоголь-індукованого ураження м'язів є хронічна алкогольна міопатія, яка зустрічається у 40-60% пацієнтів, які зловживають алкоголем [Vary, et al., 2008]. Хронічна алкогольна міопатія пов'язана із сукупністю складних біохімічних, фізіологічних і структурних змін скелетного м'яза, які виникають внаслідок тривалої алкогольної інтоксикації і призводять до втрати сили скорочення м'яза і його маси. Хронічна алкогольна міопатія проявляється гострою слабкістю у м'язах тонічними спазмами, високим рівнем тремору та міоглобінурією з високим ризиком розвитку гострої ниркової недостатності та летального результату. При патоморфологічному дослідженні м'язів за хронічної алкогольної міопатії виявляють гострий м'язовий некроз (рабдоміоліз) з деструкцією м'язових волокон і внутрішньоклітинним набряком, денерваційну спонтанну активність у вигляді потенціалів фібриляцій та зменшення амплітуди і тривалості потенціалів дії рухових одиниць [Bourgeois, et al., 2022].

Діагностика хронічної алкогольної міопатії пов'язана з низкою проблем. По-перше, хронічна форма алкогольної міопатії не супроводжується суттєвим підвищенням рівня креатинфосфокінази у крові; по-друге, при проведенні електроміографії не виявляють характерних для первинного ураження м'язів патологічних змін [Simon, et al., 2023]. Показано, що морфологічною основою хронічної алкогольної міопатії є атрофія м'язових волокон за відсутності ознак фіброзу, некрозу та запальної інфільтрації, а ступінь тяжкості атрофії пов'язаний з тривалістю вживання алкоголю і практично не залежить від його дози [Singh, et al., 2000]. Прогресуюча атрофія м'язових волокон веде до втрати майже 30% маси м'яза. Встановлено, що навіть через 5 років після припинення вживання алкоголю не відбувається регресу клінічних і морфологічних ознак захворювання [Moser, et al., 2022].

Розвиток алкогольної міопатії частково пояснюють зміненими окисно-відновними станами та дисбалансом ендогенних антиоксидантів в організмі, що зумовлює відмінність між катаболізмом і синтезом білка [Otis, et al., 2009]. Алкоголь безпосередньо сприяє утворенню активних форм кисню (АФК), а його розпад у печінці призводить до утворення молекул, подальший метаболізм яких продукує

АФК. Алкоголь стимулює активність цитохромів P_{450} , які також сприяють утворенню АФК. Таким чином, утворення АФК і окисний стрес у гепатоцитах відіграють одну з ключових ролей у розвитку алкогольної хвороби печінки [Wu, et al., 2003].

Ефективна інактивація АФК водорозчинними наночастинками C_{60} фулерену, як потужними антиоксидантами, у системах *in vivo* [Goodarzi, et al., 2017; Gaur, et al., 2021] відкриває новий напрямок для їх біомедичного застосування, зокрема у терапії захворювань, опосередкованих окисним стресом. Важливо зазначити, що мітохондрії є основною органелою продукування АФК у скелетних м'язах за розвитку алкогольної міопатії, а відтак можна припустити, що біобезпечні (принаймні за низьких діючих доз [Prylutska, et al., 2019]) водорозчинні C_{60} фулерени з активною мішенню на мітохондрії [Foley, et al., 2002] здатні зменшувати негативну дію алкоголю на функціонування м'язової системи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в межах науково-дослідної тематики кафедри біофізики та нейробіології «Біофізичні ефекти і механізми дії електромагнітних полів, наноматеріалів та фармакологічних речовин на біологічні об'єкти» (№ державної реєстрації 0106U005751, 2022-2025 рр.), проєктів науково-технічної (експериментальної) розробки МОН України «Розробка технології застосування водорозчинних C_{60} фулеренів для зменшення втоми скелетних м'язів» (№ державної реєстрації 0121U109986, 2021-2022 рр.) та «Інноваційна нанобіотехнологія для прискорення посттравматичного відновлення функціональної активності опорно-рухового апарату» (№ державної реєстрації 0124U001303, 2024-2026 рр.), а також наукового дослідження і розробки за рахунок грантової підтримки конкурсу «Наука для відбудови України у воєнний та повоєнний періоди», проєкт НФДУ «Розробка технології застосування водорозчинних C_{60} фулеренів для відновлення функціональної активності скелетних м'язів на тлі механічної травми» (№ державної реєстрації 0123U103585, 2020-2021 рр.).

Мета та завдання дослідження: метою роботи було проаналізувати скоротливу активність скелетних м'язів за хронічної алкогольної міопатії та її корекцію водорозчинними C_{60} фулеренами.

Для досягнення цієї мети були сформульовані такі основні завдання:

1. Дослідити біомеханічні параметри скорочення скелетних м'язів (швидкі та повільні) щурів після їх алкоголізації упродовж 3, 6 і 9 місяців за дії водорозчинних C_{60} фулеренів залежно від дози, схеми (до вживання алкоголю, вживання разом з алкоголем і після вживання алкоголю) та перорального застосування;
2. Дослідити біохімічні показники крові та м'язової тканини, гістологічні зміни у м'язах щурів після їх алкоголізації упродовж 3, 6 і 9 місяців за дії водорозчинних C_{60} фулеренів залежно від дози, схеми та перорального застосування;
3. Оцінити здатність водорозчинних C_{60} фулеренів зменшувати тяжкість перебігу патологічних процесів у печінці щурів після їх алкоголізації упродовж 3, 6 і 9 місяців залежно від дози, схеми та перорального застосування;
4. Дослідити механізми дії водорозчинних C_{60} фулеренів за хронічної алкогольної міопатії.

Об'єкт дослідження – скоротлива активність скелетних м'язів.

Предмет дослідження - біомеханічні параметри скорочення скелетних м'язів та біохімічні показники крові і м'язової тканини, гістологічні зміни у м'язах щурів за хронічної алкогольної міопатії та дії водорозчинних C_{60} фулеренів залежно від дози, схеми та перорального застосування.

Методи дослідження - моделювання алкогольної міопатії *in vivo*; тензометричний аналіз скоротливої активності скелетних м'язів; світлова та атомно-силова мікроскопії; динамічне розсіювання світла; молекулярна динаміка; біохімічний аналіз; гістологічний аналіз; статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Результати дослідження поглиблюють фундаментальні знання щодо розуміння скоротливої активності скелетних м'язів за розвитку хронічної алкогольної міопатії та її корекції водорозчинними C_{60} фулеренами залежно від дози, способу та схеми застосування. Зокрема, вперше запропонована терапевтична схема введення водорозчинних C_{60} фулеренів (щоденна пероральна доза 1 мг/кг разом з алкоголем упродовж експеримента) покращує біомеханічні параметри скорочення скелетних м'язів щурів на тлі їх тривалої алкоголізації, що підтверджується даними біохімічного та гістологічного аналізів. Вперше встановлено, що C_{60} фулерен знижує рівень флуктуаційних коливань сили скорочення м'язів (так званий «тремор») та подовжує час до настання їх втоми за хронічної алкогольної міопатії, зменшує тяжкість перебігу патологічних процесів у печінці щурів на тлі їх тривалої алкогольної інтоксикації, що свідчить про його гепатопротекторну дію. За використання модельних розрахунків вперше показано, що наночастинки C_{60} фулеренів здатні ефективно зв'язувати молекули етанолу, зменшуючи таким чином їх негативний вплив на функціонування м'язової системи.

Практичне значення одержаних результатів. Продемонстровані на моделях *in vivo* ефекти дії водорозчинних C_{60} фулеренів у різних часових і дозових діапазонах відкривають нові можливості для створення ефективних лікарських засобів на їх основі, що сприятиме зниженню окисного стресу у клітинах і субклітинних структурах організму та зменшенню патологічного впливу вільного етанолу на скелетно-м'язову систему.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною науковою працею, де висвітлено власні ідеї автора, які дозволили вирішити поставлені завдання. Робота містить теоретичні та методичні положення і висновки, сформульовані здобувачем особисто. Використані у дисертації ідеї та гіпотези інших авторів мають відповідні посилання.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи доповідалися на: IV науково-практичній конференції „Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм” (Тернопіль, 2013); V Всеукраїнській науково-практичній конференції „Біологічні дослідження” (Житомир, 2014 і 2015); I Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України» (Дніпропетровськ, 2014); XI міжнародній конференції “Молодь і поступ біології” (Львів, 2015); XI Міжнародній конференції «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016); XXI міжнародному медичному конгресі (Тернопіль, 2017); XI Міжнародній науково-практичній

конференції «Молода наука Волині: пріоритети та перспективи досліджень» (Луцьк, 2017); Науково-практичній конференції «Фізіологія – медицині, фармації та педагогіці: актуальні проблеми та сучасні досягнення» (Харків, 2017); VII конгресі Наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України (Одеса, 2019); Науково-практичній конференції “Прикладні аспекти морфології експериментальних і клінічних досліджень” (Тернопіль, 2019); Міжнародних наукових конференціях "Nanotechnologies and Nanomaterials" (Львів, 2022, Буковель, 2023, Ужгород, 2024, Буковель, 2025); VII, VIII та IX з'їздах Українського біофізичного товариства (Луцьк, 2015, Київ, 2019 і 2023), а також наукових семінарах ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка та кафедри фізіології людини і тварин ВНУ імені Лесі Українки.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук «Особливості електричної активності кори головного мозку при творчій літературній діяльності» була захищена 6 червня 2006 р. за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. Матеріали і висновки кандидатської дисертації не використані в жодній частині докторської дисертації автора.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 статей у наукових фахових виданнях України та 1 статтю в іноземному фаховому виданні, 17 статей у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus, з них 10 статей у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, а також 20 тез доповідей на вітчизняних і міжнародних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота у вигляді наукової доповіді викладена на 63 сторінках, складається зі вступу, чотирьох розділів, узагальнення, висновків і додатка.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Дисертацією є сукупність наукових статей з детальним аналізом сучасного стану наукової проблеми та запропонованого рішення щодо її експериментального вирішення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Усі експерименти проводили на лабораторних тваринах з дотриманням міжнародних принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986), та статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV, 21.02.2006), а також усіх загальноприйнятих норм біоетики та біологічної безпеки. Протокол дослідження був затверджений Комісією з біоетики Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №4 від 30 липня 2024 року).

В експериментах використовували щурів-самців лінії Wistar віком від 1 місяця вагою 170 ± 5 г ($n=12$ у кожній піддослідній групі). Контрольна група отримувала 100% питну воду. Піддослідні тварини (3 групи) вживали алкоголь (40% етанол у питній воді) упродовж 3, 6 і 9 місяців. Споживання кількості етанолу розраховували

у відношенні 0,5% від маси тіла тварини. Значення вмісту алкоголю у крові щурів визначали за допомогою аналізатора алкоголю (АМ1, Великобританія). Перерахунок дози проводили щодобово упродовж експерименту. Інші піддослідні тварини поряд з алкоголем вживали водний розчин C_{60} фулерену (C_{60} ВРФ) у дозі 1 мг/кг ваги тварини упродовж експерименту та були рандомно поділені на такі групи: 1 – пероральне введення C_{60} ВРФ за 1 год до прийому алкоголю; 2 – пероральне введення C_{60} ВРФ разом з алкоголем; 3 – пероральне введення C_{60} ВРФ через 1 год після прийому алкоголю.

Для отримання C_{60} ВРФ використовували метод, що базується на перенесенні молекул C_{60} з толуолу у воду за ультразвукової обробки (8 Гц, 8 год) [Ritter, et al., 2015]. Отриманий C_{60} ВРФ у максимальній концентрації 0,15 мг/мл зберігає стабільність упродовж 12–18 місяців за температури +4–25°C.

Розмір наночастинок C_{60} фулерену у C_{60} ВРФ визначали методами атомно-силової мікроскопії (АСМ) та динамічного розсіювання світла (ДРС). АСМ дані (рис. 1А) демонструють присутність у воді як поодиноких молекул C_{60} (діаметр ~0,7 нм), так і їх нанокластерів діаметром ~1,4, ~2,0, ~2,8 і ~3,5 нм.

Дані ДРС (рис. 1Б) також демонструють присутність у C_{60} ВРФ великих нанокластерів з гідродинамічним діаметром ~64 (8%), ~75 (32%), ~82 (42%) і ~106 (18%) нм. Нарешті, значення дзета-потенціалу для C_{60} ВРФ складало -25,3 мВ, що свідчить про негативний заряд поверхні наночастинок у розчині та його високу стабільність, тобто низьку ступінь агрегації наночастинок з часом.

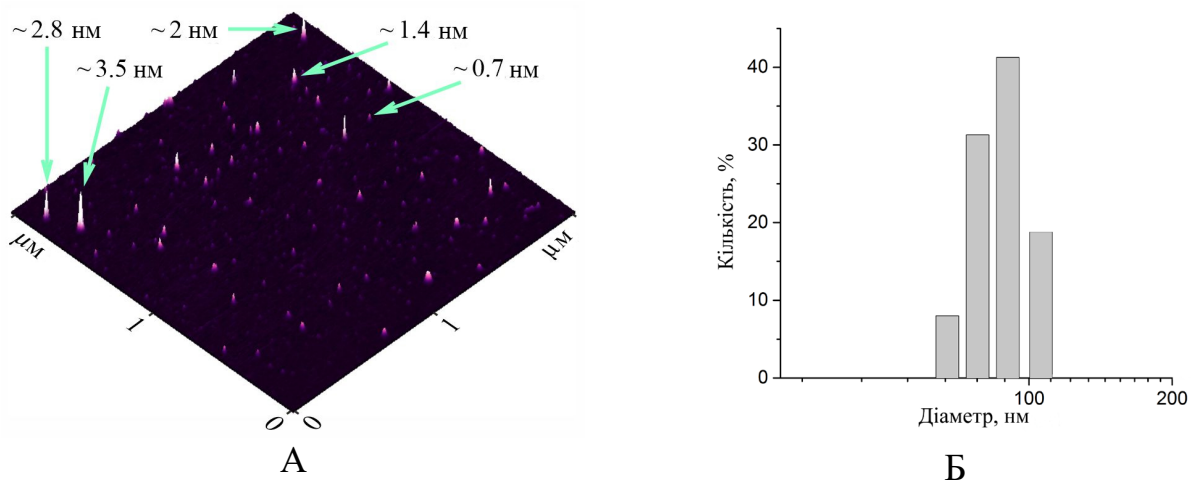


Рис. 1. АСМ зображення наночастинок C_{60} фулерену (А) та розподіл кількості наночастинок C_{60} фулерену відповідно до їх гідродинамічного діаметру (Б), присутніх у C_{60} ВРФ (0,15 мг/мл).

Для реєстрації електрофізіологічних сигналів використовували 12-ти розрядний аналого-цифровий та цифро-аналоговий перетворювач (АЦП-ЦАП, NI USB-6009, США). Вихідні імпульси ЦАП (DS2A, Digitimer, США) здійснювали стимуляцію нервів. Вхідні сигнали через підсилювач (Brownlee model 440, США) подавали на АЦП і реєстрували з частотою 10 кГц. Силу скорочення виділеного з оточуючих тканин скелетного м'яза реєстрували за допомогою тензометричного обладнання (ASI 305C-LR Dual-Mode Lever System, США). За попередньої підготовки до експерименту

анестезію піддослідних тварин здійснювали внутрішньочеревним введенням золе-тилу (25 мг/кг, Virbac, Франція). Стандартна підготовка включала канюлювання (*a. carotis communis sinistra*) для вимірювання тиску та ламінектомію на рівні поперекового відділу спинного мозку. Для підготовки до модульованої стимуляції еферентів у L4-L5 сегментах перерізували вентральні корінці безпосередньо у місцях їхнього виходу зі спинного мозку. Стимуляцію еферентів здійснювали електричними імпульсами тривалістю 2 мс, сформованими за допомогою генератора імпульсів. Контроль зовнішнього навантаження на скелетний м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів. Для формування стимулюючих сигналів використовували програмовані генератори сигналів спеціальної форми. Скорочення м'яза викликали безрелаксаційною електростимуляцією частотою 50 Гц упродовж 2, 4 і 6 с, а також частотами 10, 15 і 20 Гц упродовж 6 с. Для активації м'язової втоми використовували безрелаксаційну стимуляцію частотою 1 Гц тривалістю 1800 с.

При аналізі скоротливої відповіді скелетного м'яза використовували такі біомеханічні параметри, як маркери дисфункції певної ланки у ланцюзі «збудження – відповідь» м'яза, а саме: час зниження сили скорочення м'яза до нульового рівня після припинення стимуляції (t_0); час початку силової відповіді м'яза (латентний період; t_{start}); час зменшення сили скорочення м'яза на 50% від початкового рівня (t_{50}); час досягнення м'язовою силою максимального рівня (t_{max}); час встановлення гладкого тетанусу м'яза (t_1); імпульс сили м'яза (S - розрахована площа під кривою сили скорочення м'яза); мінімальна (F_{min}) та максимальна (F_{max}) сили скорочення м'яза; величина флуктуаційних коливань сили скорочення м'яза (Δf); амплітуда поодиноких скорочень м'яза (f_A).

Концентрації креатиніну, креатинфосфокінази (КФК), лактата (ЛА), лактатдегідрогенази (ЛДГ), пероксида водню (H_2O_2), відновленого глутатіона, карбогідрат-дефіцитного трансферина (КДТ), а також активності каталази, селен-залежної глутатіонпероксидази (ГП), супероксиддисмутази (СОД), аланін-амінотрансферази (АЛТ), аспартат-амінотрансферази (АСТ), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ) та лужної фосфатази (ЛФ) у крові та м'язовій тканині піддослідних тварин, як маркери пошкодження м'язів і печінки, визначали за допомогою біохімічних аналізаторів RNL-200 та JN-1101-TR2 (Нідерланди), ABX Micros ESV60 та Pentra C400 (Франція).

Зразки скелетних м'язів та печінки фіксували у 10% формаліні і заливали у парафін. Виготовляли зрізи товщиною 5 мкм і фарбували їх гематоксиліном та еозином або гематоксиліном та пікрофуксином за методом Ван Гісона. Цифрові мікрофотографії зразків отримували за допомогою світлового мікроскопа, суміщеного з комп'ютером (мікроскоп Olympus BX41 і цифрова фотокамера Olympus C-5050 Zoom), та проводили їх гістологічний аналіз за використання програмного забезпечення ImageJ (США).

Структура поодиноких C_{60} фулеренів була побудована за допомогою програми Avogadro [Hanwell, et al., 2012]. Нанокластери C_{60} фулеренів були побудовані за допомогою пакету програми PackMol [Martínez, et al., 2003]. Їх поміщали у розчин, що містив 1000 молекул етанолу і 23832 молекули води, що відповідає 11% спирту (модельне наближення). Молекулярна динаміка (МД) досліджуваної системи була реалізована в рамках програми NAMD [Phillips, et al., 2020] з використанням силового

поля CHARMM 36 з типом TYP3P атомів води та параметрами Girifalco VDW для молекул C_{60} [Girifalco, 1991]. Тривалість МД – 30 нс за нормальних умов.

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили за допомогою програмного пакету Statistica 8.0 (Dell, США) з використанням процедури дисперсійного аналізу (ANOVA) зі змішаним дизайном. Передбачали два міжгрупові фактори: 1) алкоголізація (три рівні – тривалість 3, 6 та 9 місяців); 2) застосування C_{60} ФВР (два рівні – відсутність та використання C_{60} ФВР). Припущення про те, що експериментальні дані відповідають нормальному розподілу були перевірені за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Для оцінки рівності дисперсій між групами використовували тест Левена. Кілька парних порівнянь між різними групами та умовами проводили за допомогою *post-hoc* тесту Бонферроні. Відмінності між групами вважали значущими за $p < 0,05$. Кожна з експериментальних силових кривих є результатом усереднення 10-ти аналогічних експериментів. Біохімічні дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартна помилка середнього для кожної групи (повторюваність вимірювань складала не менше трьох разів).

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Біомеханічні параметри скорочення скелетних м'язів щурів, біохімічні показники крові та м'язової тканини, гістологічні зміни у ній за хронічної алкогольної міопатії та дії водорозчинних C_{60} фулеренів. Хронічна алкогольна міопатія спостерігається у понад 40% осіб, які тривалий час зловживають алкоголем, і характеризується зниженням м'язової сили, розвитком проксимального парезу та атрофією скелетних м'язів. Досі не з'ясовано, який чинник має вирішальне значення для її виникнення - тривалість вживання алкоголю, чи його кількість. Зазначимо, що ця патологія найбільш виражена у м'язах, що швидко скорочуються (*musculus gastrocnemius*). Швидкі м'язи алкоголізованих тварин розвивають значно більшу силу скорочення під час високочастотної стимуляції порівняно з повільними м'язами (*musculus soleus*). Хронічне вживання алкоголю призводить до зменшення маси *musculus gastrocnemius* та площі їх поперечного перерізу. Натомість зменшення діаметру волокон *musculus soleus* є незначним за подібних умов алкоголізації.

Етанол є токсичним агентом, що чинить як прямий, так і опосередкований вплив на м'язову систему, сприяючи розвитку алкогольної міопатії. Його метаболізм тісно пов'язаний з діяльністю ферментів, залучених до процесів окисного стресу та утворення АФК, здатних пошкоджувати клітини і тканини. Окисний стрес розвивається внаслідок порушення рівноваги між генерацією АФК та ефективністю антиоксидантного захисту. Основним шляхом метаболізму етанолу є його окиснення у печінці за участю алкогольдегідрогенази, а також цитохрому P-450 2E1, що супроводжується утворенням АФК, порушенням редокс-балансу клітин та ушкодженням тканин різних органів.

У тварин, які вживали алкоголь упродовж тривалого часу, зафіксовано зниження активності ферментів системи глутатіону, посилення карбонілізації білків, підвищення рівнів холестеринових гідропероксидів і малондіальдегідів, що вказує на розвиток оксидативного ушкодження. У людей, які зловживають алкоголем, надмірна генерація АФК у мітосомальній та мітохондріальній системах призводить до порушення окиснення жирних кислот і посилення перекисного окиснення ліпідів

(ПОЛ) - мітохондріальні ураження виявляють майже у третини пацієнтів. Виявлений високий рівень гідропероксидів холестерину у швидкому м'язі порівняно з повільним м'язом свідчить про низьку антиоксидантну активність у м'язах, багатих на волокна типу II, за алкогольної міопатії. Ефективність антиоксидантних механізмів у збалансуванні підвищеного утворення АФК у швидких м'язах знижена, що робить їх більш чутливими до окисного стресу та, зрештою, веде до порушення скоротливої функції, швидкої втоми і травмування.

Вуглецеві наночастинки C_{60} фулеренів відомі як ефективні вловлювачі АФК у системах *in vitro* та *in vivo*. Їх антиоксидантний потенціал перевищує активність вітаміна Е у запобіганні порушенню мембранної цілісності. Встановлено, що водорозчинні C_{60} фулерени у малих дозах (0,1–1 мг/кг) зменшують м'язову втому щурів ефективніше, ніж традиційні антиоксиданти N-ацетилцистеїн і β -аланін, які широко застосовують у спортивній медицині. Вони легко (пасивна дифузія або ендцитоз) проникають всередину клітин та накопичуються переважно в мітохондріях. Встановлено, що величина LD_{50} для щурів за їх перорального введення становить 600 мг/кг. C_{60} фулерени накопичуються переважно в печінці, селезінці та шлунку і виводяться з організму упродовж 72 год із сечею. Згідно нещодавніх даних, водорозчинні C_{60} фулерени характеризуються тривалою кінетикою елімінації, що забезпечує їхню пролонговану (до 48 год) стимуляцію ендогенної антиоксидантної відповіді при м'язовому навантаженні.

Завданням цього етапу роботи було оцінити дію водорозчинних C_{60} фулеренів на біомеханічні показники скоротливої активності *musculus gastrocnemius* щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією залежно від дози, схеми та перорального способу введення; проаналізувати біохімічні показники крові та м'язової тканини, як маркерів м'язового пошкодження, а також морфологічні зміни у м'язових волокнах; нарешті, порівняти ефективність дії водорозчинних C_{60} фулеренів на скоротливу активність *musculus gastrocnemius* та *musculus soleus* щурів за хронічної алкогольної міопатії.

Значення концентрації алкоголю у крові щурів після хронічного вживання етанолу коливалося від 147 ± 5 мг/дл (3 місяці вживання алкоголю) до 253 ± 10 мг/дл (9 місяців вживання алкоголю). Пероральне щоденне застосування C_{60} ВРФ упродовж експеримента за оптимальної дози 1 мг/кг в рамках терапевтичної схеми (разом з алкоголем) не призводило до статистично достовірних змін у вищевказаних значеннях концентрації алкоголю у крові щурів.

У групі тварин, що вживали алкоголь, вага тіла збільшилася зі 170 ± 5 г (контроль) до 200 ± 10 , 220 ± 10 і 250 ± 10 г упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно. Нарешті, у групі тварин, що отримувала суміш алкоголю і C_{60} ВРФ (1 мг/кг), середня вага тіла не відрізнялася істотно від ваги тіла тварин, що отримували лише алкоголь (в межах статистичної похибки).

М'язова слабкість є найпоширенішим клінічним проявом хронічної алкогольної міопатії, що характеризується зниженням сили м'язів та зміною часу досягнення відповідних параметрів сили скорочення, які відповідають частоті нервових імпульсів, що спостерігають у контролі. Для оцінки міопатичних порушень у *musculus gastrocnemius* ми застосовували стимулюючий сигнал частотою 50 Гц тривалістю 6 с

(рис. 2). Як бачимо, за тривалості алкоголізації 3 місяці має місце різке зниження м'язової активності вже на 1-му скороченні (на $50 \pm 3\%$) з подальшим її зниженням на 10-му скороченні на $70 \pm 3\%$ від контрольних значень. Зі збільшенням тривалості алкоголізації щурів до 6 і 9 місяців також спостерігається зменшення амплітуди скорочення *musculus gastrocnemius*. У щурів, які отримували алкоголь і C_{60} ВРФ одночасно упродовж експерименту, спостерігали підвищення м'язової сили порівняно зі щурами з відповідної групи алкоголізації.

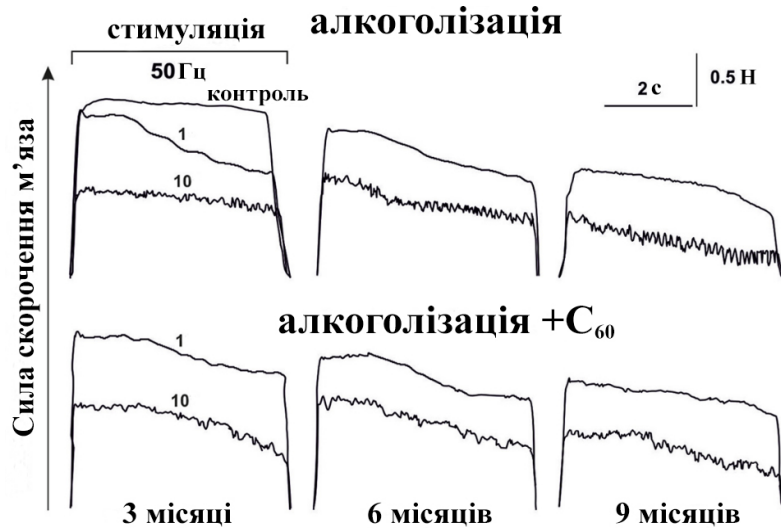


Рис. 2. Сила 1-го (1) і 10-го (10) скорочень *musculus gastrocnemius* щурів, викликаних безрелаксаційною стимуляцією частотою 50 Гц тривалістю 6 с: алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C_{60} - щури, які отримували суміш алкоголю та C_{60} ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно.

Імпульс сили м'яза, як показник його працездатності, є одним з найважливіших маркерів м'язової дисфункції. При 3, 6 і 9 місяцях алкоголізації він зменшився на 1-му скороченні *musculus gastrocnemius* на $22 \pm 2\%$, $29 \pm 1\%$ і $34 \pm 3\%$, відповідно. Слід зазначити, що на 10-му скороченні *musculus gastrocnemius* цей параметр знизився на $34 \pm 3\%$, $56 \pm 5\%$ і $74 \pm 4\%$, відповідно, порівняно з 1-м скороченням (рис. 3А). Застосування C_{60} ВРФ збільшило імпульс сили м'яза на $11 \pm 1\%$, $18 \pm 1\%$ і $26 \pm 2\%$ через 3, 6 та 9 місяців алкоголізації, відповідно, порівняно з

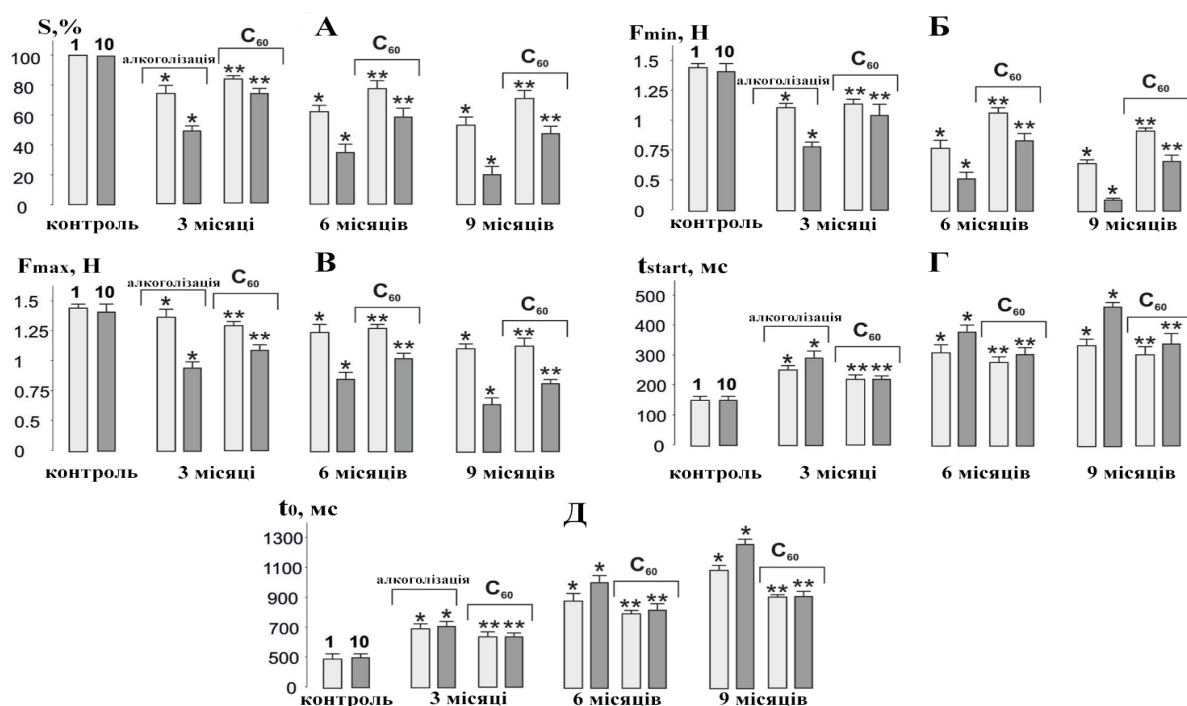


Рис. 3. Значення біомеханічних параметрів у випадку 1-го (1) і 10-го (10) скорочень *musculus gastrocnemius* щурів, викликаних безрелаксаційною стимуляцією частотою 50 Гц тривалістю 6 с: алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; C₆₀ - щури, які отримували суміш алкоголю та C₆₀ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно; S – імпульс сили м'язу (приймалася за 100% у випадку контролю) (А); F_{min} і F_{max} – мінімальний (Б) і максимальний (В) рівні м'язової сили; t_{start} - час початку силової відповіді м'язу (латентний період (Г)); t₀ - час зниження сили скорочення м'язу до нульового рівня після припинення стимуляції (Д); *p<0,05 відносно контролю; **p<0,05 відносно групи алкоголізація.

групою алкоголізація. Різниця між 1-м і 10-м скороченням *musculus gastrocnemius* зменшилася на 15–39 ± 2%.

Значення F_{min} є одним з найчутливіших маркерів м'язової дисфункції. Його зниження на 1-му скороченні *musculus gastrocnemius* становило 35 ± 3%, 56 ± 3% і 68 ± 5% при 3, 6 і 9 місяцях алкоголізації, відповідно (рис. 3Б). На 10-му скороченні цей параметр знизився на 56 ± 3%, 78 ± 4% і 91 ± 5% від контрольних значень, що свідчить про значне порушення функції м'язу. Застосування C₆₀ВРФ збільшило значення F_{min} на 10 ± 1%, 26 ± 2% і 33 ± 3% при 3, 6 та 9 місяцях алкоголізації, відповідно, порівняно з групою алкоголізація.

Значення F_{max} є маркером загальної дисфункції м'язової системи, що свідчить про зниження максимально можливої силової відповіді на тлі розвитку патології (рис. 3В). На 1-му скороченні *musculus gastrocnemius* цей показник дещо знизився, а саме на 10 ± 1%, 12 ± 1% і 21 ± 2% при 3, 6 і 9 місяцях алкоголізації, відповідно. Однак, на 10-му скороченні *musculus gastrocnemius* це зниження становило 47 ± 2%, 52 ± 3% і 64 ± 5%, відповідно, що вказує на значну дисфункцію розвитку величини F_{max}. Збільшення F_{max} при застосуванні C₆₀ВРФ становило 11 ± 1%, 17 ± 1% і 23 ± 2% при 3, 6 та 9 місяцях алкоголізації, відповідно, порівняно з групою алкоголізація.

Збільшення величини t_{start} свідчить про рівень фізіологічної дисфункції м'язового апарату при виконанні ним завдань, що вимагають максимальної сили під час точних позиційних рухів (рис. 3Г). Його збільшення становило $31 \pm 3\%$, $44 \pm 4\%$ і $49 \pm 4\%$ через 3, 6 і 9 місяців алкоголізації, відповідно, на 1-му скороченні *musculus gastrocnemius* з подальшим зростанням на $25\text{--}30 \pm 3\%$ на 10-му скороченні порівняно з контролем. Корекція цього параметра при застосуванні C_{60} ВРФ становила $15\text{--}20 \pm 2\%$ упродовж експеримента порівняно з групою алкоголізація. Слід зауважити, що у цьому випадку різниця між 1-м і 10-м скороченням *musculus gastrocnemius* не перевищувала $10 \pm 1\%$ при 9 місяцях алкоголізації.

Зростання величини t_0 свідчить про збільшення жорсткості м'яза, пов'язаної як зі збільшенням сполучнотканинних компонентів (довготривала патологія), так і зміною внутрішньом'язового тиску (гострий період патології) (рис. 3Д). Його збільшення становило $48 \pm 4\%$, $88 \pm 8\%$ і $123 \pm 8\%$ через 3, 6 і 9 місяців алкоголізації, відповідно, на 1-му скороченні *musculus gastrocnemius* з подальшим зростанням на $9\text{--}12 \pm 1\%$ на 10-му скороченні порівняно з контролем. Застосування C_{60} ВРФ зменшило цей параметр на $15 \pm 1\%$, $29 \pm 2\%$ і $41 \pm 3\%$ при 3, 6 та 9 місяцях алкоголізації, відповідно, порівняно з групою алкоголізація. Різниця між 1-м і 10-м скороченням *musculus gastrocnemius* була статистично відсутньою упродовж експерименту.

Час досягнення м'язовою силою максимального рівня (t_{max}) становив 4530 ± 46 , 5515 ± 52 і 6150 ± 55 мс через 3, 6 і 9 місяців алкоголізації тварин, відповідно (контроль: 3120 ± 28 мс) (рис. 4). Застосування C_{60} ВРФ зменшило цей параметр на $27 \pm 1\%$, $30 \pm 2\%$ і $32 \pm 2\%$ при 3, 6 і 9 місяцях алкоголізації тварин, відповідно, порівняно з групою алкоголізація.

Кількісний аналіз значення часу встановлення гладкого тетанусу м'яза (t_1) може свідчити про рівень порушень в активації м'язової сили окремими руховими одиницями. Значення цього параметра становило $3,0 \pm 0,2$ с для *musculus gastrocnemius* у контролі (рис. 5). 3-х місячна алкоголізація тварин достовірно його

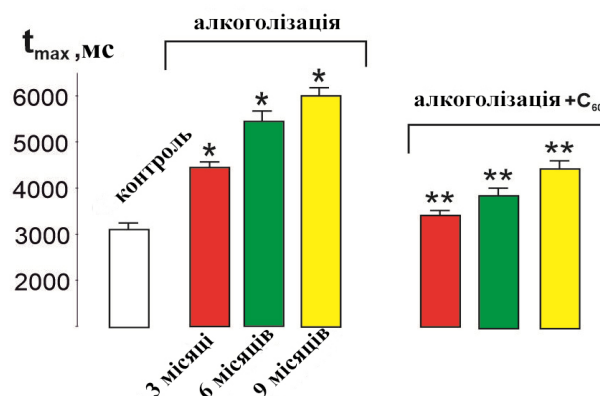


Рис. 4. Значення часу досягнення м'язовою силою максимального рівня (t_{max}) за модульованої стимуляції *musculus gastrocnemius* частотою 50 Гц тривалістю 6 с: алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C_{60} - щури, які отримували суміш алкоголю та C_{60} ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно; * $p < 0,05$ відносно контролю; ** $p < 0,05$ відносно групи алкоголізація.

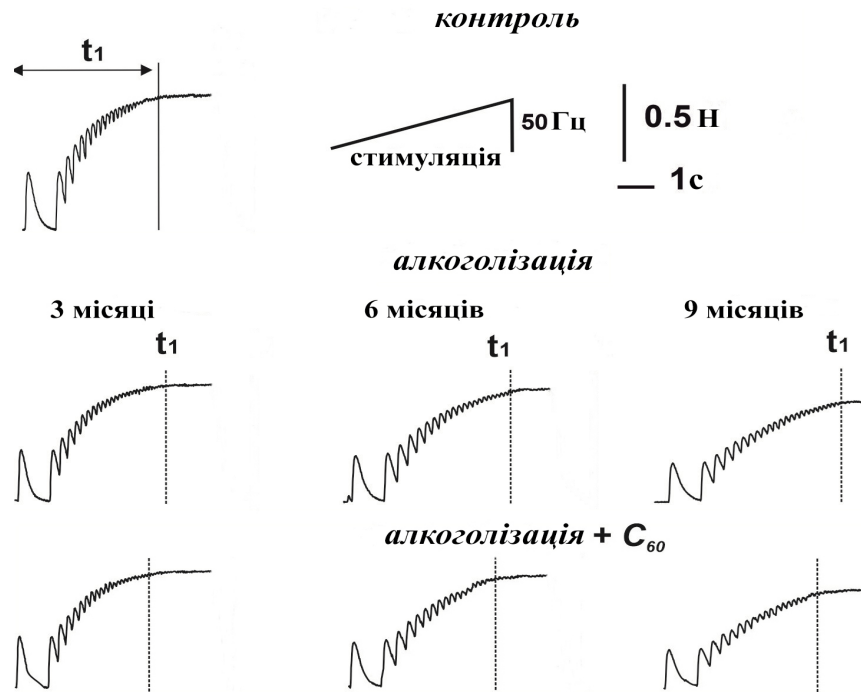


Рис. 5. Скоротлива активність *musculus gastrocnemius* щурів, викликана безрелаксаційною модульованою стимуляцією частотою 50 Гц тривалістю 6 с: алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C₆₀ - щури, які отримували суміш алкоголю та C₆₀ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно; t_1 - час встановлення гладкого тетанусу м'яза.

не змінила. Водночас, алкоголізація тварин упродовж 6 і 9 місяців підвищила це значення до величин $3,2 \pm 0,2$ і $3,5 \pm 0,2$ с, відповідно. Застосування C₆₀ВРФ скоротило цей час майже до контролю.

Таким чином, запропонована терапевтична схема введення C₆₀ВРФ (пероральна щоденна доза 1 мг/кг; разом з алкоголем упродовж експеримента) покращує вищезазначені біомеханічні параметри скоротливої активності *musculus gastrocnemius* щурів на тлі їх тривалої алкоголізації, зокрема на $29 \pm 2\%$ порівняно з групою алкоголізація упродовж 9 місяців експеримента, що добре узгоджується з даними для *musculus soleus*: $25 \pm 2\%$.

Одним з ефективних підходів щодо оцінки рівня патології м'язової системи є аналіз розвитку процесів втоми під час безрелаксаційної стимуляції м'яза. Ці процеси відіграють важливу роль у забезпеченні точного позиціонування рухів скелетно-м'язового апарата. На рис. 6А показано механограми скорочення *musculus gastrocnemius* щурів за його стимуляції частотою 1 Гц упродовж 1800 с на тлі хронічної алкоголізації та дії водорозчинних C₆₀ фулеренів. Як бачимо, має місце зменшення імпульса сили м'яза до $82 \pm 5\%$, $60 \pm 3\%$ і $22 \pm 1\%$ при 3, 6 і 9 місяцях алкоголізації, відповідно, порівняно з контролем (рис. 6Б). Застосування C₆₀ВРФ збільшило це значення до $94 \pm 4\%$, $85 \pm 2\%$ і $69 \pm 5\%$, відповідно.

Значення величини t_{50} становило 1740 ± 25 мс, 1460 ± 91 мс і 1220 ± 25 мс при 3, 6 та 9 місяцях алкоголізації, відповідно (рис. 6В). Застосування C₆₀ВРФ упродовж 3-х і 6-ти місячної алкоголізації щурів достовірно не змінило це значення. При

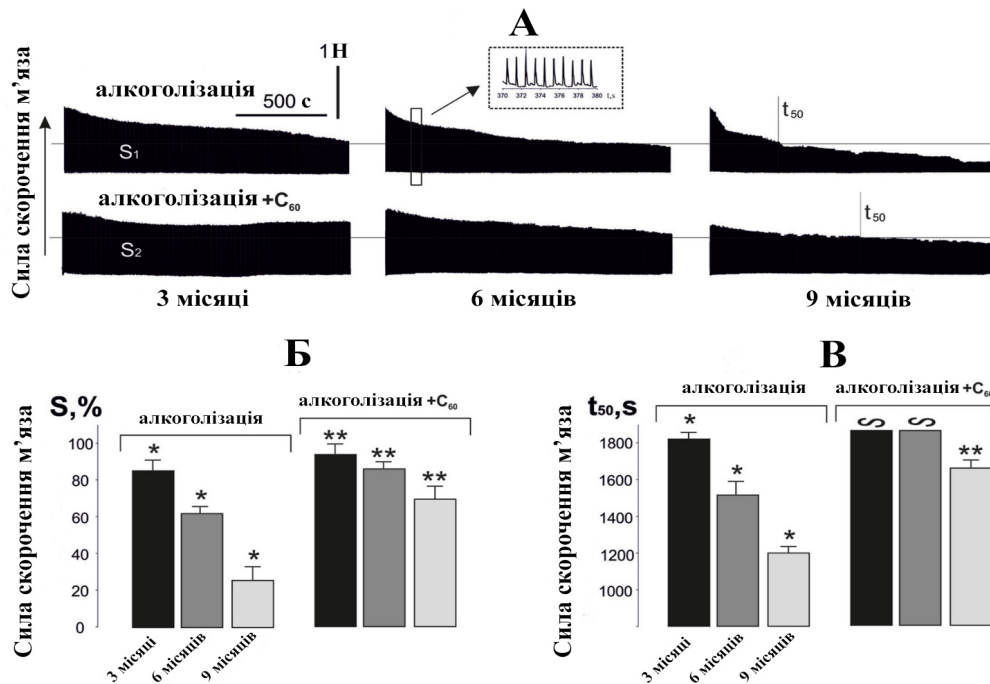


Рис. 6. Сила скорочення *musculus gastrocnemius* щурів, викликана безрелаксаційною стимуляцією частотою 1 Гц тривалістю 1800 с (А): алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C₆₀ - щури, які отримували суміш алкоголю та C₆₀ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно. Біомеханічні параметри розвитку м'язової втоми: S – імпульс сили м'яза (Б); t₅₀ - час зменшення сили скорочення м'яза на 50% від початкового рівня (В). *p<0,05 відносно контролю; **p<0,05 відносно групи алкоголізація.

алкоголізації, що тривала 9 місяців, цей параметр суттєво зріс порівняно з групою алкоголізація і становив 1620 ± 28 мс.

Отже, можна стверджувати, що запропонована терапевтична схема введення C₆₀ВРФ (пероральна щоденна доза 1 мг/кг; разом з алкоголем упродовж експеримента) значно (на $25 \pm 2\%$) подовжила час виникнення втоми у м'язах і є найбільш ефективною саме за тривалого розвитку алкогольної міопатії.

Отримані результати свідчать, що наслідком алкогольної міопатії є погіршення скоротливої активності м'язів. Причиною цього можуть бути як ультраструктурні зміни міоцитів та їх атрофія, так і порушення електролітного гомеостазу та біоелектричної активності загалом. За розвитку алкогольної міопатії насамперед відбувається гіперпродукція АФК у дисфункціональних мітохондріях, що веде до руйнування мембранних структур міоцитів та функціональних розладів їх ферментних систем, зокрема зниження активності Na⁺/K⁺-АТФази та підвищення активності Ca²⁺-АТФази. Такі міотичні порушення викликають дисбаланс у регуляції положення суглобів і прогресуючу м'язову слабкість, що зумовлює поступове зниження м'язової сили упродовж 3, 6 і 9 місяців алкоголізації. З функціональної точки зору це вказує на те, що пошкоджена м'язова клітина споживає більшу кількість високоенергетичних фосфатних сполук для підтримання гомеостазу. Як наслідок, відбувається порушення енергетичного метаболізму, що значно посилює м'язову втому на тлі алкогольної міопатії. Водночас, застосування водорозчинних C₆₀

фулеренів сприяє підвищенню енергетичної здатності функціонуючих м'язів, уражених алкогольною інтоксикацією.

Для підтвердження одержаних біомеханічних результатів було проаналізовано біохімічні показники крові, які використовують для діагностики розвитку алкогольної міопатії. Зокрема, зміни рівнів креатиніну, КФК, ЛДГ та ЛА дозволили оцінити фізіологічний стан *musculus gastrocnemius* на тлі тривалої алкоголізації тварин (рис. 7А).

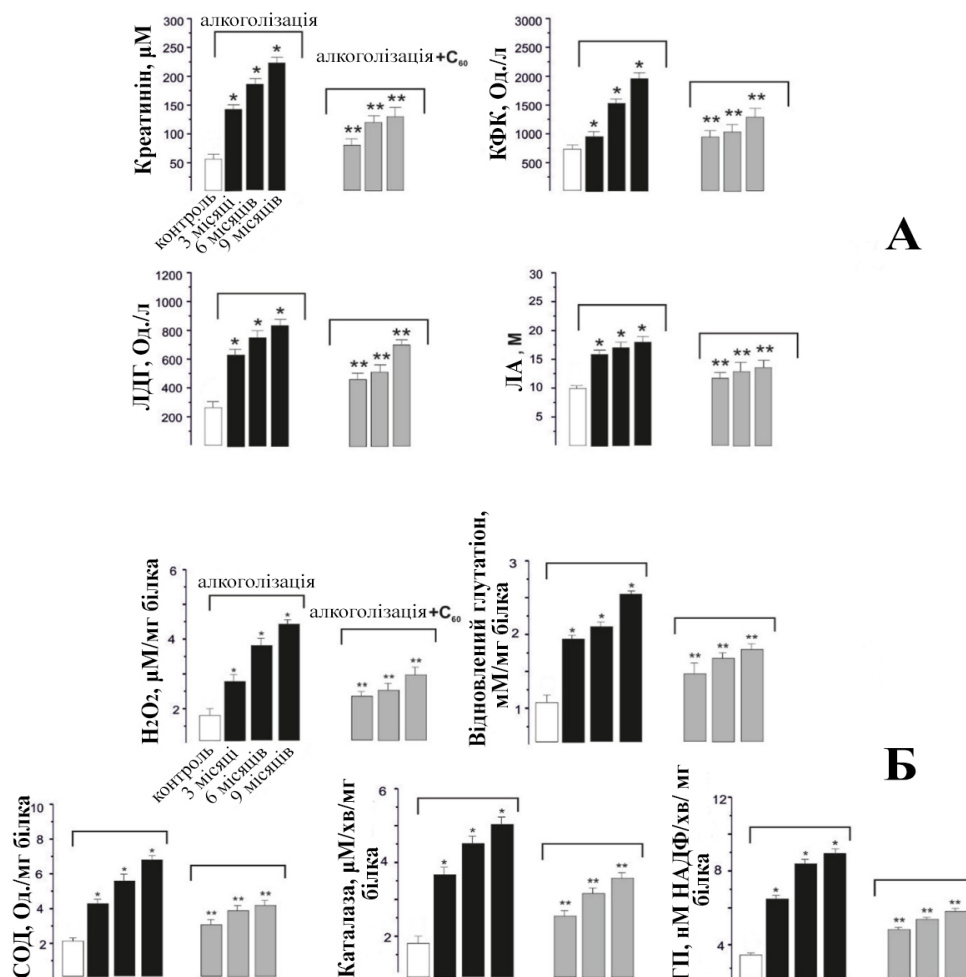


Рис. 7. Концентрація креатиніну та ЛА, активність КФК та ЛДГ у крові піддослідних тварин (А) і показники про- та антиоксидантного балансу (H_2O_2 , відновлений глутатіон, СОД, каталаза та ГП) у м'язовій тканині піддослідних тварин (Б): алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C_{60} - щури, які отримували суміш алкоголю та $\text{C}_{60}\text{ВРФ}$ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно. * $p < 0,05$ відносно контролю; ** $p < 0,05$ відносно групи алкоголізація.

Одразу зазначимо, що вищезазначені біохімічні маркери мають виражену тенденцію до зростання зі збільшенням тривалості алкоголізації тварин, що свідчить про суттєві пошкодження міоцитів, пов'язані насамперед з виснаженням їх енергозабезпечення та втратою іонного градієнта на мембрані. У випадках, коли щури вживали суміш алкоголю і $\text{C}_{60}\text{ВРФ}$, ці показники виявилися значно нижчими порівняно з тваринами, які отримували лише алкоголь. Так, креатинін знизився на $16 \pm 1\%$, $18 \pm$

1% і $37 \pm 2\%$, КФК - на $13 \pm 1\%$, $18 \pm 1\%$ і $28 \pm 2\%$, ЛДГ - на $15 \pm 1\%$, $29 \pm 2\%$ і $41 \pm 2\%$ та ЛА - на $19 \pm 1\%$, $27 \pm 2\%$ і $38 \pm 2\%$ при 3, 6 та 9 місяцях алкоголізації, відповідно, порівняно з групою алкоголізація (рис. 7А).

Кількісна оцінка показників про- та антиоксидантного балансу у тканинах досліджуваного м'яза є необхідною умовою для підтвердження антиоксидантної дії застосованих водорозчинних C_{60} фулеренів. Так, концентрація H_2O_2 зростала зі збільшенням тривалості алкоголізації і становила $151 \pm 7\%$, $327 \pm 9\%$ і $414 \pm 11\%$ при алкоголізації упродовж 3, 6 та 9 місяців, відповідно, порівняно з контролем. Застосування C_{60} ВРФ знижувало вміст H_2O_2 і відновленого глутатіона на $28 \pm 2\%$, $44 \pm 2\%$ та $51 \pm 2\%$ і $13 \pm 1\%$, $27 \pm 1\%$ та $42 \pm 2\%$, відповідно, активність СОД - на $21 \pm 1\%$, $29 \pm 1\%$ та $44 \pm 2\%$, активність каталази - на $12 \pm 1\%$, $34 \pm 2\%$ і $48 \pm 2\%$ та активність ГП - на $17 \pm 1\%$, $23 \pm 1\%$ і $39 \pm 2\%$ при алкоголізації упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно, порівняно з групою алкоголізація (рис. 7Б). Важливо відзначити, що саме збільшення вмісту відновленого глутатіона у *musculus gastrocnemius* завдяки антиоксидантній дії водорозчинних C_{60} фулеренів сприяє підвищенню стійкості м'яза до фізичних навантажень.

Отже, у всіх проведених тестах спостерігається позитивна динаміка біохімічних показників крові та м'язової тканини піддослідних щурів за терапевтичної схеми введення C_{60} ВРФ (пероральна щоденна доза 1 мг/кг; разом з алкоголем упродовж експеримента), зокрема їх покращення становило в середньому $41 \pm 2\%$ порівняно з групою алкоголізація упродовж 9 місяців експерименту (для *musculus soleus* це становило $20 \pm 2\%$).

Важливо зазначити, що зміна досліджуваних вище біомеханічних параметрів скорочення скелетних м'язів та біохімічних показників крові та м'язової тканини піддослідних тварин на тлі їх тривалої алкогольної інтоксикації не перевищувала в середньому $10 \pm 1\%$ при збільшенні дози C_{60} ВРФ вдвічі (2 мг/кг) та суттєво зменшувалася (на понад $25 \pm 2\%$) при зменшенні дози C_{60} ВРФ вдвічі (0,5 мг/кг) порівняно з використаною дозою C_{60} ВРФ 1 мг/кг. Нарешті, застосування C_{60} ВРФ за оптимальної дози 1 мг/кг у профілактичній (за 1 год до вживання алкоголю) і терапевтичній (через 1 год після вживання алкоголю) схемах були менш ефективні порівняно з дією C_{60} ВРФ за терапевтичної схеми (вживання разом з алкоголем).

Гістологічний аналіз продемонстрував, що у щурів, які вживали алкоголь упродовж 9 місяців (найдовший термін експеримента) (рис. 8Б і Д), більшість м'язових волокон тонші, ніж у контрольної групи (рис. 8А і Г), а середній діаметр волокон зменшується до 24,4 мкм (табл. 1). Є звивисті волокна. Деякі волокна мають нерівномірну товщину по всій довжині. Деякі - вакуолізовані, що свідчить про деструктивні процеси в них. У деяких волокнах поперечна смугастість менш виражена, що може вказувати на порушення правильного просторового розташування актин-міозинових комплексів. Сполучна тканина між м'язовими волокнами збільшена (рис. 8Д), внаслідок чого площа, зайнята сполучною тканиною, збільшується до $0,21 \text{ мкм}^2$ на 1 мкм^2 площі поперечного перерізу м'яза (табл. 1). Відтак, спостерігається склероз і фіброз.

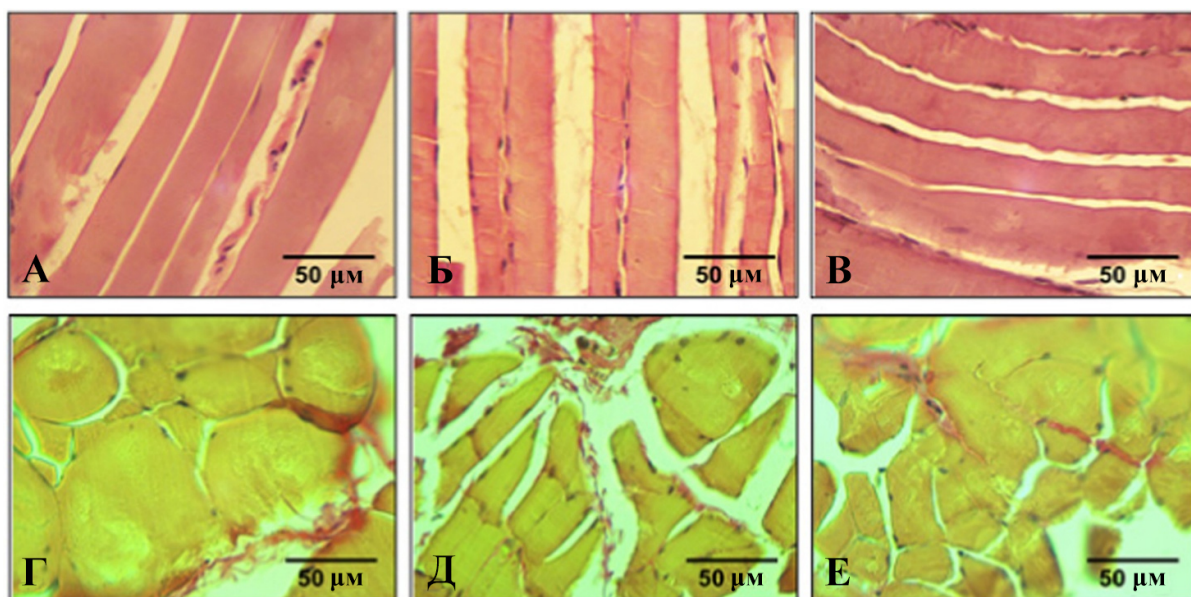


Рис. 8. Мікрофотографії волокон *musculus gastrocnemius* піддослідних щурів: А і Г – контрольна група; Б і Д – група алкоголізація; В і Е – група алкоголізація + C_{60} . А, Б і В – фарбування гематоксиліном та еозином; Г, Д і Е – фарбування гематоксиліном та пікрофуксином за методом Ван Гізона. Масштаб: 50 μm .

Таблиця 1

Морфометричні показники м'язових волокон за алкоголізації щурів та застосування C_{60} ВРФ (1 мг/кг; разом з алкоголем) упродовж 9 місяців

Група	Діаметр м'язових волокон, мкм	Площа, зайнята сполучною тканиною, мкм ² /мкм ²
Контроль	$36,7 \pm 1,3$	$0,15 \pm 0,02$
Алкоголізація	$24,4 \pm 1,4^*$	$0,21 \pm 0,02^*$
Алкоголізація + C_{60}	$32,8 \pm 2,5^{**}$	$0,17 \pm 0,02^{**}$

* $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** $p < 0,05$ порівняно з групою алкоголізація.

В алкоголізованих щурів, які отримували C_{60} ВРФ, товщина м'язових волокон і площа, зайнята сполучною тканиною, незначно зменшилася і збільшилася, відповідно, порівняно з контрольною групою (табл. 1; рис. 8В і Е). Склероз і фіброз менш виражені порівняно з групою алкоголізація упродовж 9 місяців експеримента.

На основі одержаних даних можна зробити висновок, що застосування водорозчинних C_{60} фулеренів сприяє зменшенню окислювальних процесів у м'язах шляхом підтримання балансу між прооксидантами та системою антиоксидантного захисту, запобігаючи негативному впливу АФК на клітинні та субклітинні структури за розвитку алкогольної міопатії у піддослідних тварин і, таким чином, зменшуючи деградацію м'язів.

Вплив водорозчинних C_{60} фулеренів на рівень флуктуаційних коливань сили скорочення *musculus gastrocnemius* за хронічної алкогольної міопатії. Алкогольна міопатія є більш поширеним захворюванням, аніж, наприклад, цироз, кардіоміопатія

або невропатія, спричинені алкогольною інтоксикацією організму. Тривале вживання алкоголю пригнічує синтез білка у м'язових волокнах II типу, викликає дисфункцію нервово-м'язового збудження, зменшує кількість м'язових волокон і силу м'язової відповіді. Виникнення м'язової слабкості за розвитку алкогольної міопатії певною мірою може бути компенсоване підвищеною активністю синергічних м'язових груп, що веде до уявного відчуття відсутності міотичного ураження. Однак поява значних флуктуаційних коливань сили скорочення м'яза на фазі утримання її максимальної відповіді унеможливорює корекцію точного положення суглобів. Внаслідок цього м'яз, як цілісна динамічна система, не здатний адекватно реалізувати пули нервової активності, що надходять від ЦНС. Пригнічення активності Na^+/K^+ -АТФази зменшує специфічну провідність Na^+ , як відповідь на адекватний стимул, і, таким чином, перешкоджає розвитку збудження у міоцитах. Це може викликати тимчасовий дисбаланс у часі встановлення гладкого тетанусу м'яза алкоголізованих тварин, що, в свою чергу, збільшує рівень флуктуаційних коливань його сили скорочення (так званий «тремор»).

Завданням цього етапу роботи було оцінити дію водорозчинних C_{60} фулеренів на величину флуктуаційних коливань сили скорочення *musculus gastrocnemius* щурів за хронічної алкогольної міопатії залежно від дози, схеми та пероального способу введення.

На рис. 9 представлено механограми 10-го скорочення *musculus gastrocnemius* піддослідних щурів за стимуляції різної тривалості: 2, 4 і 6 с. Як бачимо, стимуляційний сигнал тривалістю 2 с продемонстрував різке зниження сили м'язового скорочення на $19 \pm 1\%$, $22 \pm 2\%$ і $29 \pm 2\%$ через 3, 6 і 9 місяців алкоголізації тварин, відповідно, порівняно з контролем. Стимуляційний сигнал тривалістю 4 і 6 с зафіксував зниження сили м'язового скорочення на $22 \pm 1\%$, $35 \pm 2\%$, $41 \pm 4\%$ і $25 \pm 1\%$, $39 \pm 2\%$, $79 \pm 4\%$, відповідно, через 3, 6 і 9 місяців алкоголізації порівняно з контролем. У щурів, які перорально отримували суміш алкоголю та C_{60} ВРФ (оптимальна доза 1 мг/кг), спостерігали збільшення м'язової сили на $14 \pm 1\%$, $18 \pm 1\%$ і $35 \pm 2\%$ через 3 місяці алкоголізації, на $19 \pm 1\%$, $28 \pm 2\%$ і $44 \pm 2\%$ через 6 місяців алкоголізації і, нарешті, на $23 \pm 1\%$, $36 \pm 2\%$ і $59 \pm 2\%$ через 9 місяців алкоголізації тварин порівняно з групою алкоголізація, коли застосовували стимуляції тривалістю 2, 4 і 6 с, відповідно.

Алкоголізація упродовж 3-х місяців збільшила величину флуктуаційних коливань на фазі утримання максимальної сили скорочення м'яза з $0,030 \pm 0,005$ мН за тривалості стимуляції 2 с до $0,060 \pm 0,005$ мН за тривалості стимуляції 6 с (рис. 10). Зі збільшенням тривалості алкоголізації спостерігалось різке зростання цього параметра. Так, через 9 місяців вживання алкоголю величина флуктуаційних коливань перевищила $0,13 \pm 0,01$ мН. У тварин, які отримували суміш алкоголю і C_{60} ВРФ, спостерігали зниження цього параметра на $53 \pm 3\%$, $56 \pm 3\%$ і $66 \pm 3\%$ через 3, 6 і 9 місяців алкоголізації, відповідно, порівняно з групою алкоголізація.

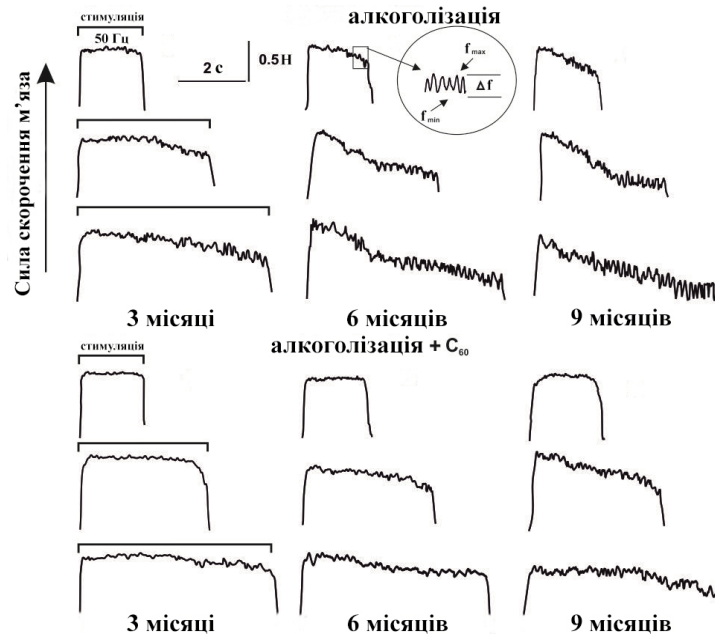


Рис. 9. Сила 10-го скорочення *musculus gastrocnemius* щурів, викликана безрелаксаційною стимуляцією частотою 50 Гц тривалістю 2, 4 і 6 с: алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C_{60} — щури, які отримували суміш алкоголю та C_{60} ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно; $f_{\max}$ і $f_{\min}$ — максимальний і мінімальний рівні амплітуд флуктуаційних коливань сили скорочення *musculus gastrocnemius* на фазі утримання максимальної відповіді.

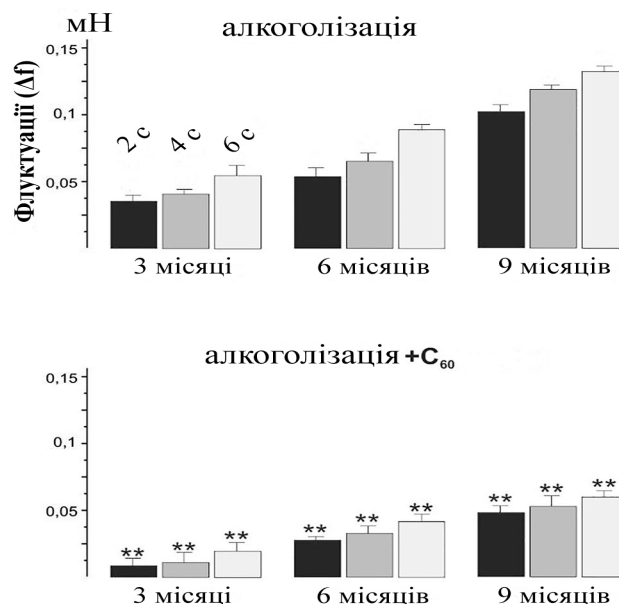


Рис. 10. Амплітуда флуктуаційних коливань ($\Delta f = f_{\max} - f_{\min}$) сили скорочення *musculus gastrocnemius* щурів, викликана безрелаксаційною стимуляцією частотою 50 Гц тривалістю 2, 4 і 6 с: алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C_{60} - щури, які отримували суміш алкоголю та C_{60} ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно. ** $p < 0,05$ відносно групи алкоголізація.

Збільшення величини флуктуаційних коливань сили скорочення *musculus gastrocnemius* алкоголізованих щурів може бути пов'язано з порушеннями процесів сумарного скорочення, подальшими часовими затримками, що перешкоджають формуванню тривалої максимальної силової відповіді м'яза. Відтак, ми детально проаналізували перехід від зубчатого до гладкого тетанусу *musculus gastrocnemius* (рис. 11).

Амплітуда поодиноких скорочень *musculus gastrocnemius* за стимуляції частотою 10 Гц збільшилася на $15 \pm 1\%$, $24 \pm 1\%$ і $56 \pm 2\%$ при алкоголізації тварин тривалістю 3, 6 і 9 місяців, відповідно, порівняно з контролем. За стимуляції частотами 15 і 20 Гц цей параметр зріс на $19 \pm 1\%$, $26 \pm 1\%$, $70 \pm 2\%$ і $27 \pm 1\%$, $48 \pm 2\%$, $80 \pm 3\%$, відповідно. Важливо зазначити, що у цих випадках не спостерігали перехід від зубчатого до гладкого тетанусу *musculus gastrocnemius*. Застосування C_{60} ВРФ стабілізувало механограми у випадку 3-х місячної алкоголізації щурів, наблизивши їх до контролю. Зі збільшенням тривалості алкоголізації щурів до 6 і 9 місяців позитивний ефект застосування C_{60} ВРФ склав відповідно $20 \pm 1\%$, $25 \pm 2\%$, $30 \pm 2\%$ і $24 \pm 1\%$, $37 \pm 2\%$, $53 \pm 3\%$ за стимуляції частотами 10, 15 і 20 Гц, відповідно, порівняно з групою алкоголізація (рис. 11), що сприяло зменшенню флуктуаційних коливань сили скорочення *musculus gastrocnemius*.

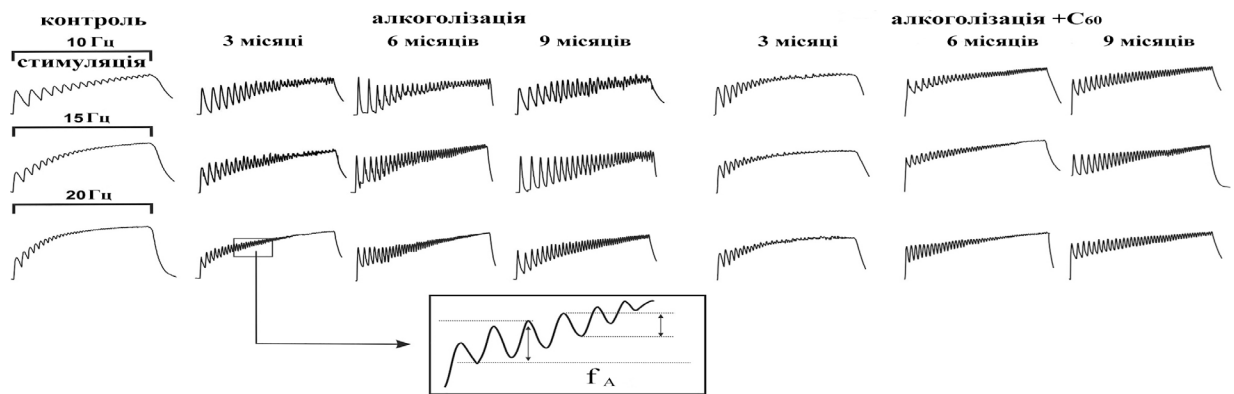


Рис. 11. Перехід від зубчатого до гладкого тетанусу *musculus gastrocnemius* при застосуванні модульованої стимуляції зі зростаючими частотами 10, 15 і 20 Гц тривалістю 6 с: алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C_{60} - щури, які отримували суміш алкоголю та C_{60} ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців - алкоголізація, що тривала 3, 6 і 9 місяців, відповідно; f_A - амплітуда поодиноких скорочень *musculus gastrocnemius*.

Отже, можна стверджувати, що запропонована терапевтична схема введення C_{60} ВРФ (пероральна щоденна доза 1 мг/кг; разом з алкоголем упродовж експеримента) значно (на $58 \pm 3\%$) зменшує рівень флуктуаційних коливань сили скорочення *musculus gastrocnemius* на фазі утримання максимальної силової відповіді («тремор») за хронічної алкогольної міопатії.

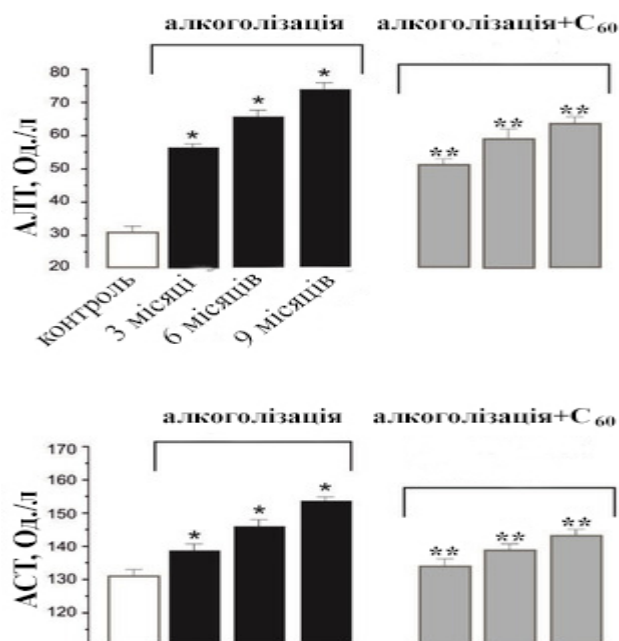


Рис. 12. Активність АЛТ і АСТ у крові піддослідних тварин: алкоголізація - щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + С₆₀ – щури, які отримували суміш етанолу і С₆₀ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців – алкоголізація упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно. * $p < 0,05$ відносно контролю; ** $p < 0,05$ відносно групи алкоголізація.

Вплив водорозчинних С₆₀ фулеренів на розвиток патологічних процесів у печінці хронічно алкоголізованих щурів. Печінка - основний орган, відповідальний за метаболізм етанолу. Під час окислення етанолу відбувається підвищене споживання коферменту НАД⁺ та зростання співвідношення НАДН/НАД⁺. Утворений ацетальдегід впливає на продукцію цитокінів, антиоксидантних ферментів і, особливо, мітохондріального та цитозольного глутатіону. Ці сполуки здатні викликати токсичні ефекти, оскільки білки, з якими вони зв'язуються, втрачають свої функції та провокують імунну реакцію. Хронічне вживання алкоголю викликає гіпоксію у печінці, де для його метаболізму необхідний додатковий кисень. Гіпоксія сприяє утворенню АФК та продуктів ПОЛ шляхом активації ксантиноксидази. Крім того, висока концентрація алкоголю стимулює абсорбцію ендотоксинів шляхом модифікації кишкової мікрофлори та пошкодження клітин епітелію. До алкогольних захворювань печінки відносять жирову дистрофію або стеатоз, стеатогепатит, алкогольний гепатит і цироз.

Завданням цього етапу роботи було оцінити ефективність дії водорозчинних С₆₀ фулеренів на розвиток патологічних процесів у печінці щурів, спричинених хронічним алкогольним отруєнням, залежно від дози, схеми та перорального способу введення шляхом аналізу основних біохімічних показників крові, як маркерів дисфункції печінки, та гістологічних і морфометричних особливостей її пошкодження.

За хронічного вживання алкоголю підвищене накопичення продуктів ПОЛ, АФК, глікозильованих білків і вуглеводів, викликаючи окисний стрес, може бути причиною цитолізу гепатоцитів, основними біохімічними маркерами якого є активності ферментів АЛТ, АСТ і ЛФ.

Як бачимо, активність АЛТ збільшилася із 31 ± 1 Од./л у контролі до 56 ± 2 , 67 ± 3 та 74 ± 3 Од./л за алкоголізації тварин тривалістю 3, 6 та 9 місяців, відповідно (рис. 12), що свідчить про значне руйнування гепатоцитів. Застосування суміші алкоголю та $C_{60}VRP$ (1 мг/кг) знизило активність цього фермента на $11 \pm 1\%$, $16 \pm 1\%$ та $18 \pm 1\%$ за алкоголізації упродовж 3, 6 та 9 місяців, відповідно, порівняно з групою алкоголізації.

Збільшення активності АСТ із 132 ± 1 Од./л у контролі до 138 ± 6 , 142 ± 7 і 154 ± 6 Од./л за алкоголізації тривалістю 3, 6 і 9 місяців, відповідно (рис. 12). Застосування $C_{60}VRP$ знизило активність цього фермента в середньому на $10 \pm 1\%$ упродовж експеримента порівняно з групою алкоголізації.

У клінічній практиці для діагностики захворювань печінки використовують співвідношення активності АСТ до АЛТ у крові: коефіцієнт де Рітиса = АСТ/АЛТ. Обидва ці ферменти мають органоспецифічність, зокрема у випадку ушкодження печінки внаслідок алкогольної інтоксикації має місце підвищення активності АЛТ у крові.

Зниження коефіцієнта де Рітиса з $0,97 \pm 0,05$ у контролі до $0,80 \pm 0,07$, $0,68 \pm 0,07$ і $0,78 \pm 0,07$ через 3, 6 і 9 місяців алкоголізації тварин свідчить про прогресуюче порушення функції гепатоцитів. Застосування $C_{60}VRP$ збільшило значення цього параметра в середньому на $14 \pm 1\%$ упродовж експеримента порівняно з групою алкоголізації (активність АЛТ знижується сильніше, ніж активність АСТ).

На відміну від інших ферментів печінки, продукція ГГТ «запускається» алкоголем і тому його активність може бути підвищеною у зловживаючих алкоголем пацієнтів навіть за відсутності захворювань печінки. Він є більш чутливим до порушень у клітинах печінки, аніж ферменти АЛТ і АСТ.

Як бачимо, активність ГГТ зросла із $1,6 \pm 0,1$ Од./л у контролі до $3,4 \pm 0,1$, $4,4 \pm 0,1$ та $5,9 \pm 0,2$ Од./л за алкоголізації тварин тривалістю 3, 6 та 9 місяців, відповідно (рис. 13). Застосування $C_{60}VRP$ знизило активність цього фермента на $15 \pm 1\%$, $18 \pm 1\%$ та $22 \pm 1\%$ за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 та 9 місяців, відповідно, порівняно з групою алкоголізації.

Активність ферменту ЛФ у крові підвищується внаслідок захворювань печінки, зокрема гепатиту, спричиненого алкогольною інтоксикацією. Як бачимо, активність ЛФ збільшилася з $8,8 \pm 0,5$ Од./л у контролі до $9,4 \pm 0,7$, $9,8 \pm 0,7$ та $10,3 \pm 0,7$ Од./л за алкоголізації тварин тривалістю 3, 6 та 9 місяців, відповідно (рис. 13). Застосування $C_{60}VRP$ зменшило активність цього ферменту в середньому на $10 \pm 1\%$ упродовж експерименту порівняно з групою алкоголізації.

Рівень КДТ є важливим маркером хронічної алкогольної інтоксикації. Перевагою його використання перед іншими полягає в тому, що він є найбільш специфічним до виявлення уражень печінки алкогольною етіологією. Як бачимо, рівень КДТ підвищився із $1,54 \pm 0,10\%$ у контролі до $1,65 \pm 0,1\%$, $1,75 \pm 0,1\%$ і $1,94 \pm 0,1\%$ за алкоголізації тварин тривалістю 3, 6 і 9 місяців, відповідно (рис. 13). Застосування

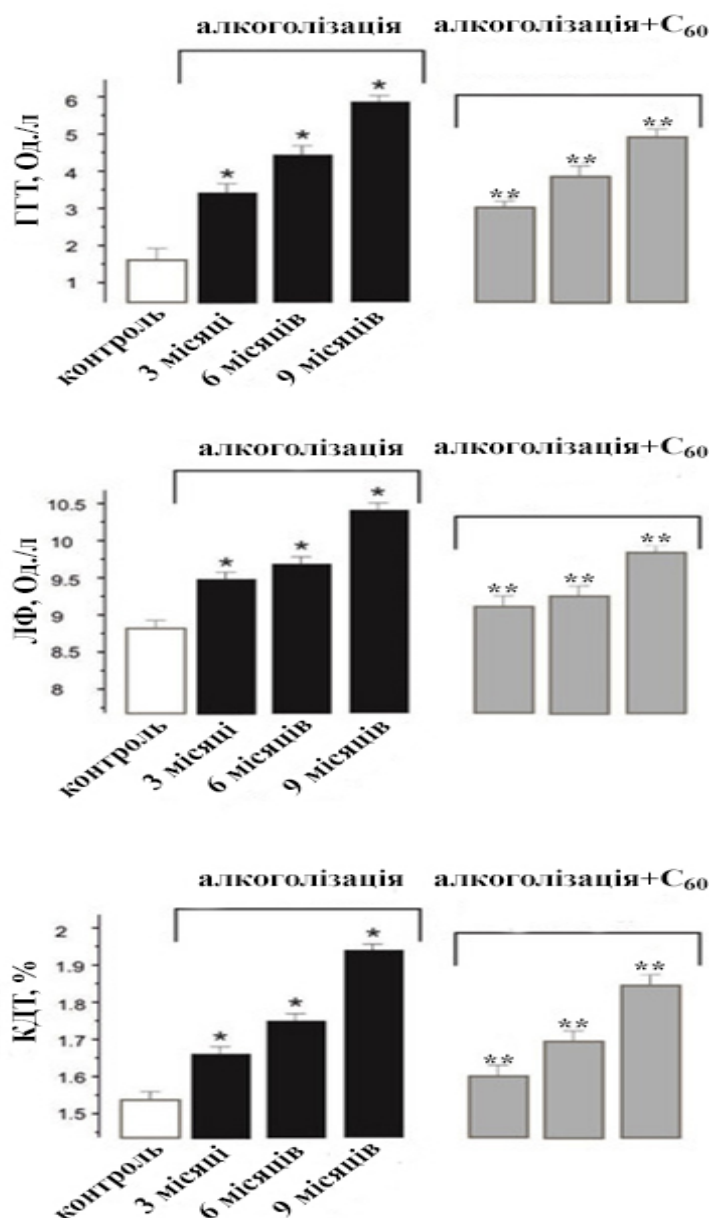


Рис. 13. Активність ГГТ і ЛФ та рівень КДТ у крові піддослідних тварин: алкоголізація — щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + С₆₀ — щури, які отримували суміш етанолу і С₆₀ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців – алкоголізація упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно. * $p < 0,05$ відносно контролю; ** $p < 0,05$ відносно групи алкоголізація.

С₆₀ВРФ знизило рівень цього показника в середньому на $10 \pm 1\%$ упродовж експеримента порівняно з групою алкоголізація.

Важливо зазначити, що застосування С₆₀ВРФ за оптимальної дози 1 мг/кг у профілактичній (за 1 год до вживання алкоголю) і терапевтичній (через 1 год після вживання алкоголю) схемах були менш ефективні щодо нормалізації патологічних станів печінки щурів на тлі їх хронічної алкогольної інтоксикації порівняно з дією С₆₀ВРФ за терапевтичної схеми (вживання разом з алкоголем).

У щурів контрольної групи гістопатологічних особливостей не спостерігали. Була присутня лише невелика кількість пікнотичних ядер у гепатоцитах (рис. 14А).

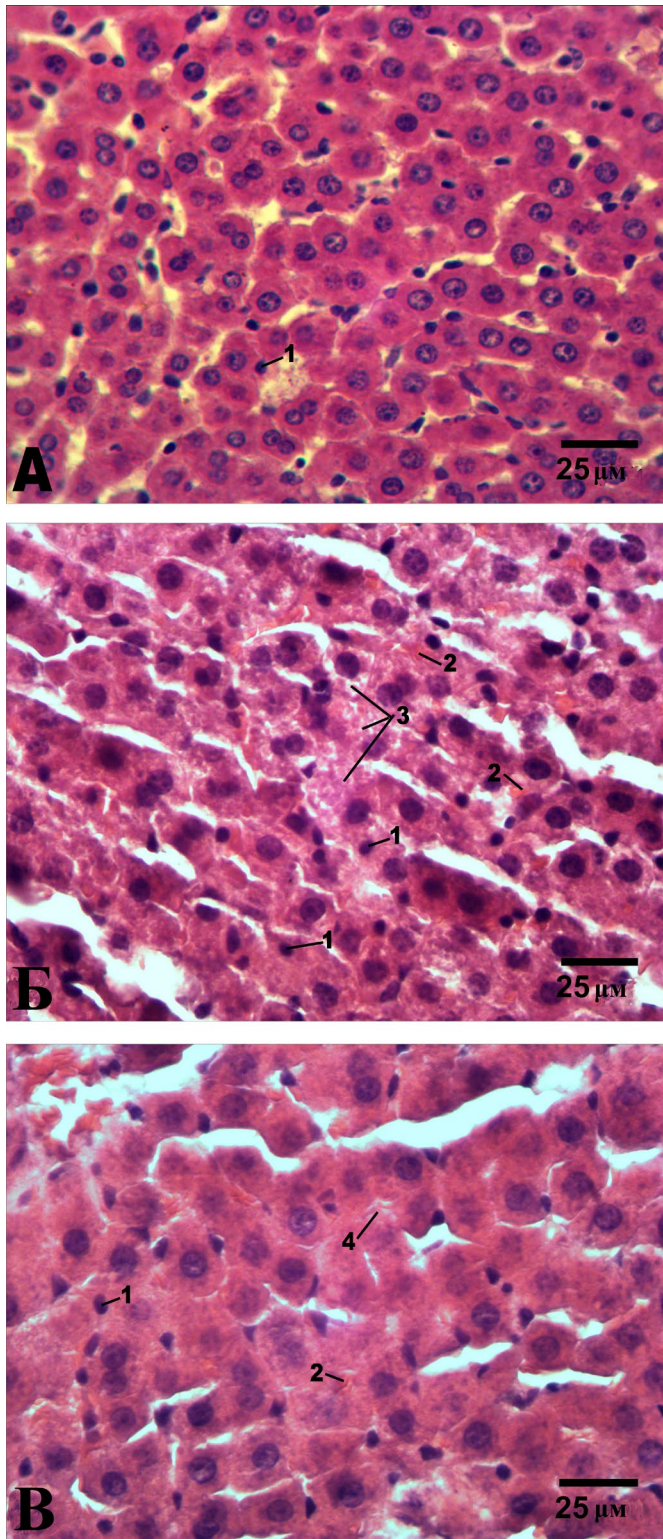


Рис. 14. Мікрофотографії препаратів печінки піддослідних тварин: А – контрольна група; Б – група алкоголізації – щури, які отримували алкоголь упродовж 9 місяців; В - група алкоголізації + C_{60} – щури, які отримували суміш етанолу і C_{60} ВРФ (1 мг/кг) упродовж 9 місяців; 1 – пікнотичні ядра; 2 – тільця Меллорі; 3 – ліпідна дистрофія з дрібними краплями та балонна дистрофія; 4 – гідропічна дистрофія. Фарбування гематоксиліном та еозином. Масштаб: 25 μ м.

У печінці алкоголізованих щурів упродовж 9 місяців (найдовший термін експеримента) спостерігали сильну гідропічну дистрофію гепатоцитів зі зростанням їх розміру внаслідок набряку або збільшення функціонального навантаження на них (табл. 2; рис. 14Б). Деякі ядра клітин пікнотичні, інші збільшені та яскраві. Також у семи тварин спостерігали дрібнокраплинну ліпідну дистрофію, а у п'яти тварин — сильну крупнокраплинну ліпідну дистрофію та балонну дистрофію гепатоцитів (рис. 14Б). Некротичні гепатоцити виявлені у великій кількості тварин (10 з 12 щурів). Деякі кровоносні судини розширені, навколо них спостерігається інфільтрація лейкоцитів. Фіксується розростання сполучної тканини.

У печінці алкоголізованих щурів, які отримували C_{60} ВРФ упродовж 9 місяців, спостерігали помірно виражену гідропічну та слабо виражену дрібнокраплинну ліпідну дистрофію гепатоцитів, балонна дистрофія відсутня (рис. 14В). Гепатоцити з пікнотичними ядрами та некротичні гепатоцити присутні, але у значно меншій кількості, ніж в алкоголізованих тварин, які не отримували C_{60} ВРФ (табл. 2). Іноді спостерігали розширені кровоносні судини з лейкоцитарними інфільтратами навколо. Має місце слабе розростання сполучної тканини (рис. 14В). Отже, гістологічні зміни у

печінці щурів, які отримували водорозчинні C_{60} фулерени разом з алкоголем, є значно меншими, що свідчить про їх гепатопротекторну дію.

Отже, можна стверджувати, що запропонована терапевтична схема введення C_{60} ВРФ (1 мг/кг; разом з алкоголем) зменшує тяжкість перебігу патологічних процесів у печінці щурів на тлі їх хронічної алкогольної інтоксикації, зокрема у всіх проведених тестах спостерігається позитивна динаміка біохімічних показників крові (в середньому на $15 \pm 2\%$), як маркерів ураження печінки, що підтверджується гістологічними даними.

Таблиця 2

Гістологічні особливості печінки піддослідних щурів: алкоголізація – щури, які отримували алкоголь упродовж 9 місяців; алкоголізація + C_{60} – щури, які отримували суміш етанолу і C_{60} ВРФ (1 мг/кг) упродовж 9 місяців

Показник / Групи	Контроль	Алкоголізація	Алкоголізація + C_{60}
Об'єм ядра гепатоцита, мкм ³	138 ± 8	$248 \pm 11^*$	$284 \pm 19^{**}$
Площа поперечного перерізу гепатоцита, мкм ²	205 ± 11	$273 \pm 20^*$	$244 \pm 11^{**}$
Пікнотичні ядра у гепатоцитах	+	++	+
Тільця Меллорі	—	+++	++
Ліпідна дистрофія гепатоцитів	—	+++	+
Гідропічна дистрофія гепатоцитів	—	+++	++
Балонна дистрофія гепатоцитів	—	++	—
Некротичні гепатоцити	—	++	+
Розширення кровоносних судин	—	++	+
Інфільтрація запальними клітинами	—	++	+
Розростання сполучної тканини (фіброз)	—	+	+

* $p < 0,05$ відносно контролю; ** $p < 0,05$ відносно групи алкоголізація. Інтенсивність проявів: «—» – не виявлено; «+» – слабка; «++» – помірна; «+++» – виражена

Механізми дії водорозчинних C_{60} фулеренів за хронічної алкогольної міопатії. Відомо, що розвиток хронічної алкогольної міопатії пов'язаний зі зміною окисно-відновного стану та дисбалансом ендогенних антиоксидантів в організмі. Ці порушення викликають зниження вмісту АТФ у скелетних м'язах і зменшення окисно-відновного співвідношення $НАД^+/НАДН$, що супроводжується збільшенням

витоку електронів, головним чином із комплексу III (убіхінону), і сприяє утворенню мітохондріальних АФК та зворотному транспорту електронів. У сукупності ці процеси індукують мітохондріальні дисфункції скелетних м'язів, пригнічення синтеза білків та посилення аутофагії. Алкоголь посилює активність цитохрому P450, що також сприяє утворенню АФК. Нарешті, метаболізм етанолу в печінці призводить до утворення високореактивних сполук, а їх подальший метаболізм також пов'язаний з продукцією АФК.

Ефективна інактивація АФК наночастинками C_{60} фулеренів у модельних системах *in vivo* відкриває реальні перспективи їх широкого застосування у біомедицині. Показано, що C_{60} фулерен виявляє більш потужні антиоксидантні властивості порівняно з природними антиоксидантами — вітамінами С і Е, а також екзогенними антиоксидантами - N-ацетилцистеїн і β -аланін, які часто застосовують у спортивній медицині.

Слід зазначити, що мітохондрії є основними органелами, відповідальними за генерацію АФК у пошкоджених скелетних м'язах. Відтак, C_{60} фулерени з мітохондріальним таргетуванням можуть виступати ефективними антиоксидантами у терапії м'язових патологій, опосередкованих окисним стресом.

Завданням цього етапу роботи було з'ясувати можливі механізми дії водорозчинних наночастинок C_{60} фулеренів на *in vivo* моделі хронічної алкоголізації шляхом аналізу біохімічних показників крові піддослідних тварин та комп'ютерного моделювання.

Щоб перевірити антиоксидантну дію C_{60} фулеренів, пов'язану з модифікацією АФК-залежних механізмів та їх впливом на активність ендогенних антиоксидантів, ми проаналізували показники про- та антиоксидантного балансу, а саме активності СОД, каталази і ГП, концентрації відновленого глутатіона і H_2O_2 у крові щурів за тривалої алкогольної інтоксикації.

СОД є найпотужнішим природним антиоксидантом і ферментом першої лінії антиоксидантного захисту організму. Як бачимо з рис. 15, активність СОД збільшилася з $1,7 \pm 0,1$ Од./мл у контролі до $3,8 \pm 0,3$, $4,8 \pm 0,4$ і $5,9 \pm 0,5$ Од./мл за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно. Застосування C_{60} ВРФ (1 мг/кг; разом з алкоголем) знизило ці показники на $37 \pm 3\%$, $38 \pm 3\%$ та $39 \pm 3\%$ за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно, порівняно з групою алкоголізація.

Каталаза запобігає утворенню високореактивних гідроксильних радикалів. Як бачимо з рис. 15, активність каталази зросла з $1,3 \pm 0,1$ мМ/хв до $2,2 \pm 0,1$, $2,5 \pm 0,1$ і $3,5 \pm 0,2$ мМ/хв за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно. Застосування C_{60} ВРФ знизило ці показники на $33 \pm 3\%$, $34 \pm 3\%$ і $37 \pm 3\%$ за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно, порівняно з групою алкоголізація.

За розвитку хронічної алкогольної міопатії спостерігали значне підвищення концентрації відновленого глутатіона: вона зросла з $2,0 \pm 0,1$ μ М у контролі до $3,2 \pm 0,2$, $3,9 \pm 0,2$ і $5,5 \pm 0,3$ μ М за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно. Застосування C_{60} ВРФ знизило ці показники на $22 \pm 1\%$, $23 \pm 1\%$ і $31 \pm 3\%$ за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно, порівняно з групою алкоголізація (рис. 15). Крім того, за дії C_{60} ВРФ спостерігали також зниження активності ГП на $20 \pm 2\%$, $22 \pm 2\%$ і $26 \pm 2\%$ за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно,

порівняно з групою алкоголізації. Ці результати підтверджують здатність C_{60} фулеренів впливати на процеси синтезу і метаболізму глутатіона у м'язовій тканині за патологічних станів різного генезу.

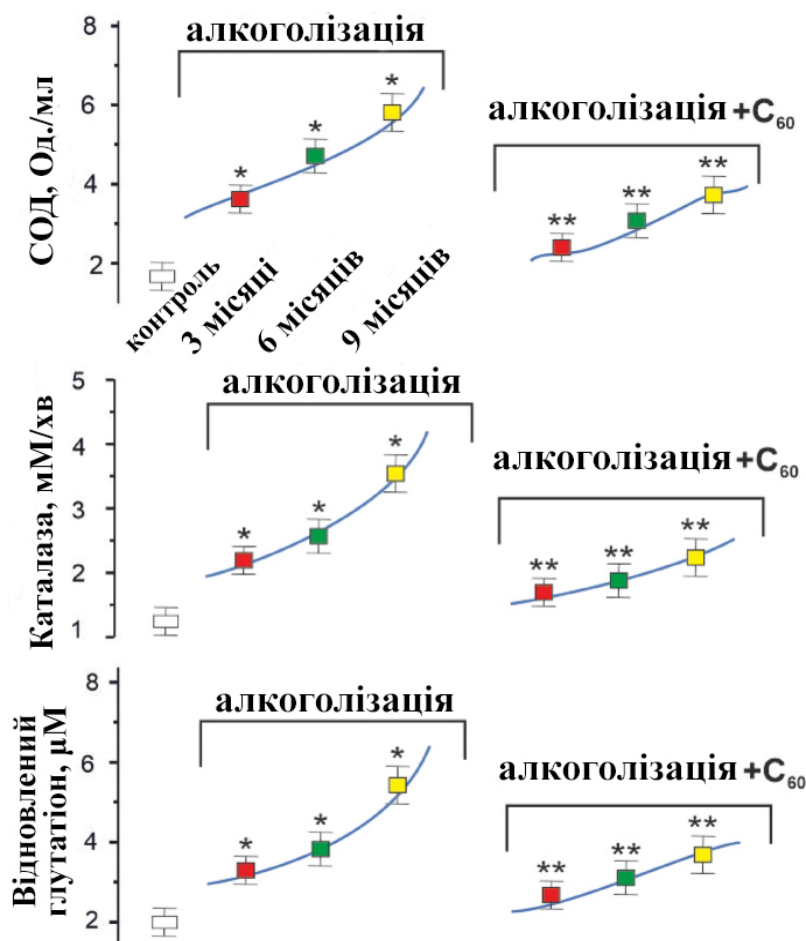


Рис. 15. Показники про- та антиоксидантного балансу (СОД, каталаза і відновлений глутатіон) у крові піддослідних тварин: алкоголізація – щури, які отримували алкоголь; алкоголізація + C_{60} – щури, які отримували суміш етанолу і C_{60} ВРФ (1 мг/кг); 3, 6 і 9 місяців – алкоголізація упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно. * $p < 0,05$ відносно контролю; ** $p < 0,05$ відносно групи алкоголізації.

Нарешті, застосування C_{60} ВРФ зменшило вміст H_2O_2 на $21 \pm 2\%$, $24 \pm 2\%$ і $29 \pm 2\%$ за алкоголізації тварин упродовж 3, 6 і 9 місяців, відповідно, порівняно з групою алкоголізації. Цей результат підтверджує той факт, що C_{60} фулерени здатні проникати через мембрани клітин без ознак їх пошкодження.

Відомо, що саме активності СОД і ГП та концентрації ферментів, пов'язаних з відновленням глутатіоном, є мішенями регуляторного білка захисту клітин від окисного стресу - Nrf2. Як бачимо, водорозчинні наночастинки C_{60} фулерена нормалізують рівень відновленого глутатіона та активність білків, пов'язаних з ним. Це свідчить про те, що поряд з іншими потенційними механізмами, антиоксидантний шлях Nrf2/ARE може бути задіяний у регуляції гомеостазу глутатіона. Нарешті, можна припустити, що C_{60} фулерени, як протизапальні агенти, здатні пригнічувати активацію транскрипційного фактора – регулятора запальних процесів у клітинах - NF- κ B, зменшуючи таким чином продукцію прозапальних цитокінів, що підтверджується іншими авторами.

Проведені біохімічні дослідження виявили значне підвищення маркерів крові експериментальних тварин, пов'язаних з окисним стресом, на тлі розвитку хронічної алкогольної міопатії. Це свідчить, що м'язова система виконує роботу, яка є занадто інтенсивною для її фізіологічного рівня. За алкогольної міопатії АФК утворюються головним чином у дисфункціональних мітохондріях, що викликає руйнування клітинних мембран та функціональні порушення їх ферментних систем. Це може призвести

до тимчасового порушення балансу у часі встановлення гладкого тетануса м'яза, що, у свою чергу, збільшує час, необхідний йому для виконання силової вправи. З іншого боку, відомо, що понад 90% спожитого алкоголю метаболізується в організмі окисними та неокисними шляхами, утворюючи такі хімічно активні сполуки, як ацетальдегід, ацетат, етиловий ефір жирної кислоти тощо. Ці сполуки також генерують АФК, які спричиняють підвищення окисного стресу та ПОЛ, порушуючи тим самим структурну цілісність клітин і функції тканин загалом. Покращення біохімічних показників (в середньому на $30 \pm 3\%$ порівняно з групою алкоголізація), досягнуте завдяки застосуванню екзогенних антиоксидантів C_{60} фулеренів з мітохондріальним таргетуванням, демонструє їх здатність порушувати цикл окисного стресу та мітохондріальної дисфункції.

Підсумовуючи, можна запропонувати такі механізми дії C_{60} фулеренів: (1) безпосередньо, ефективно інактивуючи АФК, та (2) опосередковано, впливаючи, наприклад, на Nrf2/ARE (стимулювання) і NF- κ B (пригнічення) сигнальні шляхи, які беруть участь у регуляції антиоксидантних ферментів, C_{60} фулерени нормалізують функціональний стан м'язової системи за розвитку хронічної алкогольної міопатії.

Результати МД моделювання показали, що поодинокі C_{60} фулерени та їх нанокластери з 2, 3 і 4 молекул є нестабільними у середовищі «вода + етанол». Стабільними виявилися такі нанокластери (рис. 16, А-Г): 5 молекул C_{60} ($5C_{60}$) розташовані у вершинах трикутної біпіраміди, максимальна діагональ якої становить 2,2 нм; $10C_{60}$ і $13C_{60}$ є майже сферичними з діаметрами 2,5 і 2,9 нм, відповідно; $20C_{60}$ має еліпсоїдальну форму з найдовшою головною віссю 3,4 нм і двома іншими, приблизно рівними 2,5 нм. Мінімальна відстань між сусідніми C_{60} фулеренами у нанокластерах, які безпосередньо взаємодіють між собою, становить 0,27 нм, а максимальна – 0,32 нм.

Було розраховано кількість контактів між нанокластерами C_{60} і молекулами етанолу і води (табл. 3). Як бачимо, в середньому кількість контактів між нанокластерами C_{60} і водою лише на 23% більша, ніж з етанолом, що свідчить про здатність одержаних нанокластерів адсорбувати на своїй поверхні як молекули етанолу, так і молекули води. Найменша відстань між поверхнею нанокластерів C_{60} і молекулами етанолу становить 0,24 нм. Більшість ОН-груп етанолу орієнтуються на молекули води, прагнучи утворити з ними водневі зв'язки (рис. 16Д). Мережа цих водневих зв'язків стає щільнішою зі збільшенням розміру нанокластера. Загалом, кількість адсорбованих молекул етанолу напряму залежить від розміру нанокластерів C_{60} (рис. 16; табл. 3).

Підсумовуючи, можна запропонувати такий механізм дії C_{60} фулеренів. Етанол розповсюджується з кровотоку по всіх тканинах і рідинах організму. На концентрацію етанолу в тканинах впливає відносний вміст води. Подібно до води, етанол може проникати через клітинні мембрани. Важливо, що у крові відсутні білки, які зв'язуються з етанолом. З іншого боку, відомо, C_{60} фулерени та їх нанокластери здатні ефективно адсорбувати на своїй поверхні різні ароматичні молекули у водному середовищі та проникати всередину клітин. Відтак, високостабільні нанокластери C_{60} фулеренів (розміром 2,2-3,4 нм і більше) здатні ефективно зв'язувати молекули етанолу в організмі, виключаючи їх з метаболічного циклу, і, таким чином, зменшувати негативний вплив алкоголю на функціонування м'язової системи.

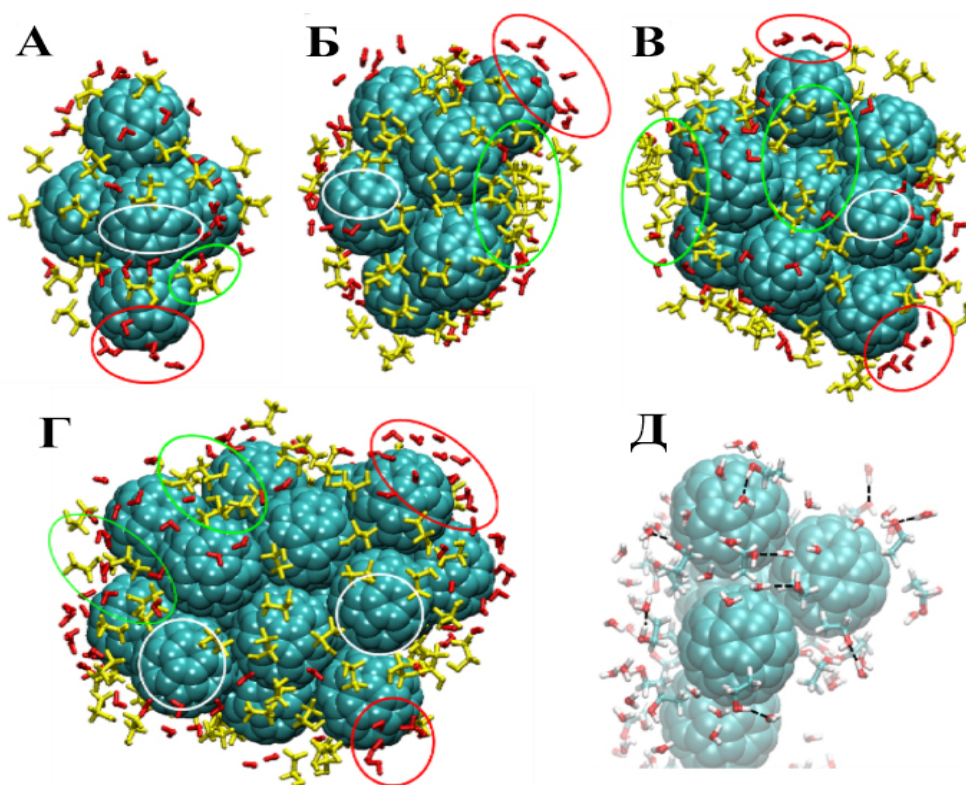


Рис. 16. Розраховані стабільні нанокластери $5C_{60}$ (А), $10C_{60}$ (Б), $13C_{60}$ (В) і $20C_{60}$ (Г). Молекули води позначені червоним кольором, етанол – жовтим. Кола позначають: білим – «сухі» ділянки, зеленим – порожнини між C_{60} фулеренами, червоним – опуклі поверхні. Фрагмент нанокластера $5C_{60}$ з першою оболонкою сольватації етанолу, де молекули зайняті водою в межах 0,24 нм (Д): чорні пунктирні лінії показують водневі зв'язки між ОН-групами етанолу та водою; атоми кисню позначені червоним кольором, атоми водню – білим, а атоми вуглецю – блакитним.

Таблиця 3

Розрахована середня кількість контактів між молекулами етанолу або води і C_{60} фулеренами залежно від їх кількості у нанокластері

Кількість C_{60} фулеренів у нанокластері	Середня кількість контактів етанол – C_{60}	Середня кількість контактів вода – C_{60}
5	25 ± 4	29 ± 6
10	44 ± 5	67 ± 9
13	55 ± 6	74 ± 11
20	75 ± 6	93 ± 11

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Представлені результати досліджень біомеханічних параметрів скоротливої активності скелетних м'язів, біохімічних показників крові та м'язової тканини, гістології м'язів і печінки щурів за тривалої алкогольної інтоксикації та дії водорозчинних C_{60} фулеренів залежно від дози, схеми і перорального застосування.

Показано, що тривала алкоголізація тварин (упродовж 3, 6 і 9 місяців) викликає зниження силової відповіді м'язів порівняно з контролем. Так, наприклад, має місце

зменшення значень імпульса сили *musculus gastrocnemius*, його мінімальної та максимальної сили скорочення на $74 \pm 4\%$, $91 \pm 5\%$ та $64 \pm 4\%$, відповідно, що вказує на значну м'язову дисфункцію за розвитку алкогольної міопатії упродовж 9 місяців. Водночас, застосування С₆₀ВРФ (щоденна пероральна доза 1 мг/кг разом з алкоголем) збільшило ці параметри на $26 \pm 2\%$, $33 \pm 3\%$ та $23 \pm 2\%$, відповідно, порівняно з групою алкоголізація.

Важливо зазначити, що за тривалої алкоголізації тварин зростає величина флуктуаційних коливань сили скорочення *musculus gastrocnemius* на фазі утримання максимальної силової відповіді (так званий «тремор»): через 9 місяців вона становила $0,13 \pm 0,01$ мН (майже втричі перевищила контроль). У тварин, які отримували суміш алкоголю і С₆₀ВРФ, спостерігали значне зниження цього параметра, а саме на $66 \pm 3\%$ порівняно з групою алкоголізація.

Зафіксовано збільшення часових характеристик силової відповіді м'язів за тривалої алкоголізації тварин порівняно з контролем. Так, наприклад, значення часу початку силової відповіді *musculus gastrocnemius*, часу зниження сили його скорочення до нуля після припинення стимуляції, часу досягнення силою скорочення максимального рівня та часу встановлення гладкого тетануса зросли в середньому на $79 \pm 4\%$, $145 \pm 8\%$, $50 \pm 3\%$ та $15 \pm 1\%$, відповідно, що вказує на збільшення жорсткості м'яза, підвищення його втоми та порушення в активації сили скорочення окремими руховими одиницями за розвитку алкогольної міопатії упродовж 9 місяців. Застосування С₆₀ВРФ (щоденна пероральна доза 1 мг/кг разом з алкоголем) зменшило ці параметри на $20 \pm 2\%$, $41 \pm 3\%$ і $32 \pm 2\%$, відповідно, порівняно з групою алкоголізація, а час встановлення гладкого тетануса *musculus gastrocnemius* майже наблизився до контролю.

Для підтвердження одержаних біомеханічних результатів було проаналізовано біохімічні показники крові, зокрема концентрації креатиніну, КФК, ЛДГ і ЛА, та прота антиоксидантного балансу (концентрації H₂O₂ та відновленого глутатіону, активності СОД, каталази і ГП) у тканинах *musculus gastrocnemius*. Усі вони мають виражену тенденцію до зростання зі збільшенням тривалості алкоголізації тварин, що свідчить про значні пошкодження міоцитів. У тварин, які вживали суміш алкоголю і С₆₀ВРФ, ці показники виявилися значно нижчими порівняно з тваринами, які отримували лише алкоголь. Так, концентрація креатиніну знизилася на $37 \pm 2\%$, КФК - на $28 \pm 2\%$, ЛДГ - на $41 \pm 2\%$, ЛА - на $38 \pm 2\%$, H₂O₂ - на $51 \pm 2\%$ і відновленого глутатіону - на $42 \pm 2\%$, а активність СОД - на $44 \pm 2\%$, каталази - на $48 \pm 2\%$ і ГП - на $39 \pm 2\%$ за алкоголізації тварин упродовж 9 місяців порівняно з групою алкоголізація.

Зазначимо також, що одержані результати для *musculus soleus* (повільний м'яз) корелюють з динамікою вищеописаних біомеханічних і біохімічних даних для *musculus gastrocnemius* (швидкий м'яз) піддослідних тварин.

Гістологічний аналіз продемонстрував, що у щурів, які вживали алкоголь упродовж 9 місяців, більшість м'язових волокон тонші, ніж у контрольної групи, а середній діаметр волокон зменшується до 24,4 мкм. Є звивисті волокна. Деякі волокна мають нерівномірну товщину по всій довжині, а деякі - вакуолізовані, що свідчить про деструктивні процеси в них. Сполучна тканина між м'язовими волокнами збільшена, внаслідок чого площа, зайнята сполучною тканиною, зростає до 0,21 мкм² на 1 мкм²

площі поперечного перерізу м'яза. Відтак, спостерігається склероз і фіброз. В алкоголізованих щурів, які отримували C_{60} ВРФ (щоденна пероральна доза 1 мг/кг разом з алкоголем), товщина м'язових волокон і площа, зайнята сполучною тканиною, незначно зменшилася і збільшилася, відповідно, порівняно з контрольною групою. Склероз і фіброз були менш вираженими.

Окремо була проаналізована тривала дія алкоголю на розвиток патологічних процесів у печінці щурів шляхом оцінки основних біохімічних показників крові, як маркерів дисфункції печінки, та гістологічних і морфометричних особливостей її пошкодження. Так, наприклад, мало місце збільшення активностей АЛТ, АСТ, ГГТ і ЛФ та рівня КДТ на $58 \pm 3\%$, $15 \pm 1\%$, $73 \pm 4\%$ і $15 \pm 1\%$ та $11 \pm 1\%$, відповідно, порівняно з контролем, що є наслідком прогресуючого руйнування гепатоцитів. Застосування суміші алкоголю та C_{60} ВРФ знизило ці показники в середньому на $15 \pm 2\%$ упродовж експеримента порівняно з групою алкоголізації.

У печінці алкоголізованих щурів упродовж 9 місяців спостерігали сильну гідропічну дистрофію гепатоцитів зі зростанням розміру клітин. У деяких тварин спостерігали дрібнокраплинну/крупнокраплинну ліпідну дистрофію, а у інших - балонну дистрофію гепатоцитів. У більшості піддослідних тварин виявлено некротичні гепатоцити. Деякі кровоносні судини розширені, навколо них спостерігається інфільтрація лейкоцитів. Фіксується розростання сполучної тканини. Водночас, у печінці алкоголізованих щурів, які отримували C_{60} ВРФ (щоденна пероральна доза 1 мг/кг разом з алкоголем) упродовж 9 місяців, спостерігали помірно виражену гідропічну та слабо виражену дрібнокраплинну ліпідну дистрофію гепатоцитів, балонна дистрофія була відсутня, що свідчить про гепатопротекторну дію водорозчинних C_{60} фулеренів.

Підсумовуючи, можна стверджувати: одержані вище біомеханічні, біохімічні та гістологічні результати свідчать про значну дисфункцію скелетних м'язів і печінки за тривалої алкогольної інтоксикації організму, які насамперед проявляються у зниженні максимальної сили скорочення м'яза, порушенні динаміки розвитку тетануса, підвищенні м'язової втоми та появі «тремора», в активації процесів окисного стресу, атрофії м'язових волокон, порушенні структури міофібрил та деструкції гепатоцитів. Водночас, пероральне застосування водорозчинних C_{60} фулеренів за оптимальної дози 1 мг/кг та найбільш ефективної терапевтичної схеми (щоденно разом з алкоголем упродовж експеримента) здатне суттєво покращити скоротливу активність скелетних м'язів, зокрема зменшити амплітуду флуктуаційних коливань їх сили скорочення («тремор») та збільшити час до настання втоми, відновити біохімічні показники крові та м'язової тканини, запобігти розвитку тяжких патологічних станів печінки, викликаних алкогольною інтоксикацією.

Нарешті, для перевірки антиоксидантної дії C_{60} фулеренів, пов'язаної з модифікацією АФК-залежних механізмів та їх впливом на активність ендогенних антиоксидантів, було проаналізовано показники про- та антиоксидантного балансу, а саме активності СОД, каталази і ГП, концентрації відновленого глутатіона і H_2O_2 у крові щурів за тривалої алкогольної інтоксикації. Так, наприклад, активності СОД і каталази зросли майже в 3,5 і 2,7 рази, відповідно, а концентрація відновленого глутатіона – у 2,8 рази порівняно з контролем за розвитку алкогольної міопатії упродовж 9 місяців. Застосування C_{60} ВРФ (щоденна пероральна доза 1 мг/кг разом з алкоголем) знизило

ці показники на $39 \pm 3\%$, $37 \pm 3\%$ і $31 \pm 3\%$, відповідно, порівняно з групою алкоголізації.

З іншого боку, в рамках комп'ютерного експеримента було встановлено, що C_{60} фулерени утворюють стабільні нанокластери, які містять 5 і більше молекул, розміром 2,2 нм і більше у водному середовищі. Показано, що такі нанокластери C_{60} фулеренів здатні адсорбувати на своїй поверхні молекули етанолу, причому тим більшу кількість, чим більший їхній розмір.

Враховуючи ці результати, можна запропонувати такі можливі механізми дії C_{60} фулеренів: (1) безпосередньо, ефективно інактивуючи АФК, та (2) опосередковано, впливаючи на сигнальні шляхи, які беруть участь у регуляції антиоксидантних ферментів, C_{60} фулерени здатні нормалізувати функціональний стан м'язової системи за розвитку хронічної алкогольної міопатії; (3) стабільні нанокластери C_{60} фулеренів, потрапляючи в організм, здатні ефективно зв'язувати молекули етанолу, виключаючи їх з метаболічного циклу, і, таким чином, зменшувати негативний вплив алкоголю на організм загалом і скоротливу активність скелетних м'язів, зокрема.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі детально проаналізовано основні біомеханічні параметри скоротливої активності скелетних м'язів (швидкі та повільні), біохімічні показників крові та м'язової тканини, гістології м'язів та печінки щурів за тривалої алкогольної інтоксикації та дії водорозчинних C_{60} фулеренів залежно від дози, схеми (до вживання алкоголю, вживання разом з акоголем і після вживання алкоголю) та перорального застосування. Одержані *in vivo* результати вказують на можливість використання цих вуглецевих наночастинок для корекції патологічних станів скелетних м'язів та супутніх метаболічних порушень, викликаних алкогольною інтоксикацією, що потребує подальших клінічних випробувань.

Вперше показано, що тривале вживання алкоголю (3, 6 і 9 місяців) викликає:

1. Значні зміни у скоротливій активності скелетних м'язів щурів обох типів (повільний та швидкий) порівняно з контролем, які проявляються насамперед у зниженні максимальної і мінімальної сили скорочення, порушенні динаміки розвитку гладкого тетануса, підвищенні втоми та появі «тремора». Застосування водорозчинних C_{60} фулеренів у терапевтичній схемі введення (пероральна щоденна доза 1 мг/кг разом з алкоголем упродовж експеримента), яка виявилася найбільш ефективною, нормалізує час встановлення гладкого тетануса м'язів, покращує біомеханічні параметри їх силової відповіді в середньому на $35 \pm 3\%$, зокрема зменшуючи «тремор» в середньому на $60 \pm 6\%$ та подовжуючи час виникнення втоми у м'язах в середньому на $25 \pm 2\%$ порівняно з групою алкоголізації упродовж 9 місяців експеримента;

2. Значне зростання досліджуваних біохімічних показників крові та м'язової тканини, як маркерів дисфункції м'язів, порівняно з контролем, що свідчить про активацію процесів окисного стресу та ПОЛ. Гістологічний аналіз скелетних м'язів виявив атрофію м'язових волокон, вакуолізацію саркоплазми та порушення структури міофібрил, що підтверджує розвиток хронічної алкогольної міопатії. Застосування водорозчинних C_{60} фулеренів у терапевтичній схемі введення

(пероральна щоденна доза 1 мг/кг разом з алкоголем упродовж експеримента) відновлює біохімічні показники крові (концентрації креатиніну, КФК, ЛДГ і ЛА) та м'язової тканини (концентрації H_2O_2 і відновленого глутатіона, активності СОД, каталази і ГП) в середньому на $30 \pm 3\%$ порівняно з групою алкоголізація упродовж 9 місяців експеримента. Дані гістологічного аналізу засвідчили, що товщина м'язових волокон і площа, зайнята сполучною тканиною, незначно зменшилася і збільшилася, відповідно, порівняно з контрольною групою. Склероз і фіброз були менш вираженими порівняно з групою алкоголізація упродовж 9 місяців експеримента;

3. Значні порушення у функціонуванні печінки щурів порівняно з контролем, про що свідчить зростання біохімічних показників крові - ферментів-маркерів її ураження. У печінці алкоголізованих щурів упродовж 9 місяців спостерігали сильну гідропічну дистрофію гепатоцитів зі зростанням розміру клітин, дрібнокраплинну/крупнокраплинну ліпідну дистрофію та балонну дистрофію. Виявлено некротичні гепатоцити, фіксується розростання сполучної тканини. Застосування водорозчинних C_{60} фулеренів у терапевтичній схемі введення (пероральна щоденна доза 1 мг/кг разом з алкоголем упродовж експерименту) знижує активність АЛТ, АСТ, ГГТ і ЛФ та рівень КДТ в середньому на $15 \pm 2\%$ упродовж експерименту порівняно з групою алкоголізація. У печінці спостерігали помірно виражену гідропічну та слабо виражену дрібнокраплинну ліпідну дистрофію гепатоцитів, балонна дистрофія була відсутня, що свідчить про гепатопротекторну дію водорозчинних C_{60} фулеренів;

4. Значне зростання показників про- та антиоксидантного балансу (активності СОД, каталази і ГП, концентрації відновленого глутатіона і H_2O_2) у крові щурів. Застосування водорозчинних C_{60} фулеренів у терапевтичній схемі введення (пероральна щоденна доза 1 мг/кг разом з алкоголем упродовж експеримента) знизило їх значення в середньому на $30 \pm 3\%$ за алкоголізації тварин упродовж 9 місяців порівняно з групою алкоголізація. Це вказує на те, що C_{60} фулерени, як антиоксиданти, з одного боку, здатні ефективно інактивувати АФК, індуковані алкогольною інтоксикацією організму, а з іншого, - активувати захисну дію антиоксидантної системи у відповідь на розвиток цієї патології. Нарешті, модельні розрахунки показали, що наночастинки C_{60} фулеренів здатні ефективно зв'язувати молекули етанолу, виключаючи їх з метаболічного циклу, і, таким чином, зменшувати негативний вплив алкоголю на функціонування скелетних м'язів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. О. Motuziuk, D. Nozdrenko, S. Prylutska, I. Vareniuk, K. Bogutska, S. Braniuk, O. Korotkyi, Yu. Prylutskyu, U. Ritter, J. Piosik. The effect of C_{60} fullerene on the mechanokinetics of *muscle gastrocnemius* contraction in chronically alcoholized rats. *Heliyon*, 2023;9(8):e18745. **(Q1)** (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

2. О. Motuziuk, D. Nozdrenko, S. Prylutska, K. Bogutska, I. Mishchenko, O. Abramchuk, S. Khrapaty, U. Ritter, Yu. Prylutskyu. C_{60} fullerene reduces the level of

fluctuations in the force response of *muscle gastrocnemius* in chronically alcoholized rats. *Applied Nanoscience*, 2023;13(10):7057-7067. (**Q2**) (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

3. D. Nozdrenko, **O. Motuziuk**, S. Prylutska, T. Matvienko, K. Bogutska, D. Franskevych, N. Nurishchenko, O. Abramchuk, Yu. Prylutsky. C₆₀ fullerene protective effect against the rat *muscle soleus* trauma. *Heliyon*, 2024;10(11):e32677. (**Q1**) (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

4. **O. Motuziuk**, D. Nozdrenko, S. Prylutska, I. Vareniuk, V. Cherepanov, K. Bogutska, S. Rudenko, Yu. Prylutsky, J. Piosik, U. Ritter. C₆₀ fullerene reduces the level of liver damage in chronic alcohol intoxication of rats. *Molecules*, 2024;29(13):2951. (**Q1**) (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

5. Yu. Prylutsky, D. Nozdrenko, O. Omelchuk, S. Prylutska, **O. Motuziuk**, V. Soroca, I. Vareniuk, V. Stetska, K. Bogutska, U. Ritter, J. Piosik. Effect of C₆₀ fullerene on muscle injury-induced rhabdomyolysis and associated acute renal failure. *International Journal of Nanomedicine*, 2024;19:8043-8058. (**Q1**) (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

6. Yu. Prylutsky, D. Nozdrenko, **O. Motuziuk**, S. Prylutska, K. Bogutska, O. Abramchuk, A. Morenko, D. Franskevych, P. Scharff, U. Ritter. C₆₀ fullerene reduces the development of post-traumatic dysfunction rat *muscle soleus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024;25(22):12206. (**Q1**) (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

7. Yu. Prylutsky, D. Nozdrenko, **O. Motuziuk**, S. Prylutska, N. Nurishchenko, D. Franskevych, V. Soroca, V. Cherepanov, I. Kalinin, O. Korzhyk, U. Ritter. C₆₀ fullerene improves the contractile activity of the injured rat *muscle gastrocnemius*. *Nanotechnology*, 2025;36(12):125101. (**Q2**) (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

8. Yu. Prylutsky, D. Nozdrenko, **O. Motuziuk**, S. Prylutska, I. Vareniuk, N. Nurishchenko, D. Franskevych, V. Soroca, K. Bogutska, U. Ritter. C₆₀ fullerene promotes post-traumatic recovery of the rat *muscle gastrocnemius*. *Nanomedicine*, 2025;20(6):571-584. (**Q2**) (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

9. **O. Motuziuk**, D. Nozdrenko, S. Prylutska, Y. Osyp, K. Bogutska, O. Dmytrotsa, Yu. Prylutsky, P. Scharff, U. Ritter. C₆₀ fullerenes diminish dysfunctions in rat *muscle*

soleus with chronic alcohol intoxication. *Journal of Nanotechnology*, 2025;2025:Article ID 9916259. **(Q2)** (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

10. **O. Motuziuk**, D. Nozdrenko, S. Prylutska, N. Tverdokhlebo, M. Petrovsky, S. Vyzhva, Yu. Prylutskyu, P. Scharff, U. Ritter. The effect of C₆₀ fullerene on the *musculus gastrocnemius* contraction in chronically alcohol-exposed rats and the potential mechanism of its action. *Scientific Reports*, 2025;15:32651. **(Q1)** (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань та модельних розрахунків, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

Праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

Статті:

1. O. Melnychuk, **O. Motuziuk**, S. Shvayko, S. Zay. Progressive fatigue dynamic development of isolated natively *musculus gastrocnemius medialis* in alcoholic rats. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету*. 2015;2(302):179–184. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

2. О. Мельничук, **О. Мотузюк**, Т. Поручинська. Аналіз інтенсивності змін силової продуктивності *m. gastrocnemius* в алкоголізованих щурів із 6-годинною васкулярною ішемією задніх кінцівок. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2015;69:27–40. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

3. О.А. Мельничук, **О.П. Мотузюк**, С.Е. Швайко. Зміна параметрів тетанічного скорочення *m. soleus* в алкоголізованих щурів за умов унілатеральної васкулярної ішемії м'язів задніх кінцівок. *Фізіологічний журнал*. 2015;61(3):81–90. **(Scopus)**. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

4. S. Zay, D. Zavodovskyi, D. Nozdrenko, K. Bogutska, **O. Motuziuk**, Yu. Sklyarov, Yu. Prylutskyu. Chronic alcoholization: effect on musculoskeletal system and remedial action of C₆₀ fullerenes. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2016;7(3):273–284. (Участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

5. С. Зай, **О. Мотузюк**, В. Білобров, Д. Улицька, О. Ноздренко, О. Абрамчук. Зміна швидко-силових параметрів скорочення *musculus soleus* щурів при хронічній алкоголізації. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету*. 2017;13(362):90–97. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

6. С. Зай, **О. Мотузок**, В. Білобров, Д. Улицька, О. Ноздренко, О. Абрамчук. Вплив ВРС₆₀ на швидко-силові параметри тетанічного скорочення *m. soleus* алкоголізованих щурів за умови експериментально-індукованої ішемії різної тривалості. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2017;2(23):59–64. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
7. С. Зай, Т. Матвієнко, В. Білобров, Д. Улицька, **О. Мотузок**. Динаміка скорочення *m. gastrocnemius medialis* щурів при хронічній алкоголізації. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету*. 2017;7(356):215–221. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
8. С.Ю. Зай, **О.П. Мотузок**, В.Ю. Білобров, Д.А. Вулицька, О.А. Ноздренко, О.М. Абрамчук. Зміни силової відповіді *musculus soleus* у алкоголізованих щурів з експериментально-індукованою ішемією тривалістю 1 та 2 години. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія»*. 2017;29:82–88. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
9. Yu.I. Prylutskyi, D.M. Nozdrenko, S.Yu. Zay, **O.P. Motuziuk**, K.I. Bogutska, A.V. Ilchenko. Influence of C₆₀ fullerenes on the mechanokinetic and biochemical parameters of *muscle soleus* contraction in chronically alcoholised rats with experimentally-induced ischemia. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2018;16(3):583–596. (**Scopus**). (Участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
10. **О. Мотузок**, В.С. Пикалюк. Гістологічні особливості *m. gastrocnemius* щура за умов хронічної алкоголізації та ішемії різної тривалості. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Серія: Біологічні науки*. 2019;3(387):137–147. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
11. **О. Мотузок**, Д. Мельничук. Гістологічні особливості волокон литкового м'язу щурів при ішемії та використанні C₆₀ фулеренів в ролі антиоксидантів. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Серія: Біологічні науки*. 2019;4(388):84–96. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
12. D.M. Nozdrenko, **O.P. Motuziuk**, K.I. Bogutska, V.L. Osetskyi, Yu.I. Prylutskyi. Dynamics of contraction of the *musculus soleus* of rats in chronic alcoholization and

therapeutic action of water-soluble C₆₀ fullerenes. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*. 2019;17(2):399–408. **(Scopus)**. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

13. **O.P. Motuziuk**, D.M. Nozdrenko, K.I. Bogutska, O.V. Remeniak, Yu.I. Prylutskyu. Morphological changes in the ischemic muscle fibres of *musculus soleus* at chronic alcoholization of animals and application of an aqueous colloidal solution of C₆₀ fullerenes. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*. 2019;17(4):697–708. **(Scopus)**. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

14. N. Wang, **O. Motuziuk**, I. Mischenko. 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):83–91. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

15. N. Wang, **O. Motuziuk**, I. Mishchenko, Y. Zhou. Levels of relevant inflammatory factors and oxidative stress markers in alcoholic myopathy: a meta-analysis. *Chinese General Practice*. 2022;25(33):4123–4129. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

16. **O. Motuziuk**, D. Nozdrenko, S. Prylutska, K. Bogutska, O. Korotkyi, Yu. Prylutskyu. Biochemical parameters of blood and tissue of the *muscle gastrocnemius* in chronically alcoholized rats under oral administration of C₆₀ fullerene aqueous solution. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2023;95(2):58–67. **(Scopus)**. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

17. **О.П. Мотузюк**, Д.М. Ноздренко, К.І. Богуцька, Н.Е. Нурищенко, В.Л. Осецький, Ю.І. Прилуцький. Біомеханічні параметри розвитку втомлювальних процесів у *muscle gastrocnemius* щурів за хронічної алкоголізації та застосування водорозчинних C₆₀ фулеренів. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2023;21(3). **(Scopus)**. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

18. D. Nozdrenko, N. Wang, **O. Motuziuk**, S. Prylutska, O. Vygovska, K. Bogutska, O. Dmytrotsa, O. Lynchak, Y. Prylutskyu. The effect of C₆₀ fullerenes on the recovery of *muscle soleus* contraction dynamics in rats after chronic alcoholization. *Біологічні студії/ Studia Biologica*. 2024;18(1):43–56. **(Scopus)**. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, участь у проведенні експериментальних вимірювань, аналіз та

обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

Тези наукових доповідей:

1. О.А. Мельничук, **О.П. Мотузіук**. Силові характеристики скорочення *m. gastrocnemius* у алкоголізованих щурів за умов унілатеральної васкулярної ішемії. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм: матеріали IV наук.-практ. конф.* – Тернопіль, 2013. – С. 142–145.
2. О.А. Мельничук, Н.Г. Савіцька, **О.П. Мотузіук**. Вплив етилового спирту на швидкість досягнення максимальної сили *m. gastrocnemius* за умов васкулярної ішемії. *Біологічні дослідження – 2014: збірник V Всеукр. наук.-практ. конф.* – Житомир: ЖДУ ім. І. Франка, 2014. – С. 354–357.
3. О.А. Мельничук, **О.П. Мотузіук**. Зміна контрактильних характеристик функціонально-спеціалізованих скелетних м'язів у алкоголізованих щурів за умов васкулярної ішемії задніх кінцівок. *Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України: матеріали I Всеукр. наук.-практ. конф.* – Дніпро: Вид-во ДНУ, 2014. – С. 58–61.
4. О.А. Melnychuk, S.Ye. Shvayko, N.H. Savitska, **O.P. Motuziuk**. The change of successive muscular contraction of frequency summation in ischemic *m. gastrocnemius medialis* in alcoholic rats. *Біологічні дослідження 2015: збірник наук. праць.* – Житомир: ПП «Рута», 2015. – С. 341–344.
5. О. Melnychuk, **O. Motuziuk**, S. Shvayko. Frequency summation efficiency of successive muscular contraction of *m. gastrocnemius medialis* (MGM) tetanus in alcoholic rats. *Матеріали VI з'їзду Українського біофізичного товариства (27–30 травня 2015 р., Луцьк–Світязь, Україна).* – Луцьк–Світязь, 2015. – С. 86.
6. О. Мельничук, **О. Мотузіук**, С. Швайко. Вплив хронічної алкогольної інтоксикації на характер зміни силової продуктивності ішемізованого *m. gastrocnemius medialis* у лабораторних щурів. *Матеріали XI Міжнар. конф. (20–24 квітня 2015 р., Львів).* – Львів, 2015. – С. 477–478.
7. С.Ю. Зай, **О.П. Мотузіук**, Ю.В. Лукницька. Особливості тетанічного скорочення ішемізованого *m. soleus* алкоголізованих щурів за дії водного розчину C_{60} фулеренів. *Біологія: від молекули до біосфери: тези доповідей XI Міжнар. конф. (26 листопада – 2 грудня 2016 р., Харків).* – Харків: ХНУ ім. В.Н. Каразіна, 2016. – С. 50–51.
8. І. Міщенко, **О. Мотузіук**, А. Линник. Розвиток втоми скелетних м'язів за дії наночастинок C_{60} фулеренів. *XXI Міжнародний медичний конгрес.* – Тернопіль: Укрмедкнига, 2017. – С. 256.
9. І. Міщенко, **О. Мотузіук**. Вплив C_{60} фулеренів на розвиток втоми скелетних м'язів. *Фізіологія – медицині, фармації та педагогіці: актуальні проблеми та сучасні досягнення.* – Харків, 2017. – С. 87–88.
10. І. Міщенко, **О. Мотузіук**, А. Линник. Порівняльний аналіз антиоксидантних властивостей наночастинок C_{60} фулеренів і N-ацетилцистеїну в умовах розвитку м'язової втоми. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини, 14 червня 2017 р.* – Тернопіль: ТДМУ, 2017. – С. 328–330.

11. О. Дубнік, **О. Мотузіук**. Морфологічні зміни в скелетних м'язах за умов ішемії різної тривалості та алкогольної інтоксикації. *Молода наука Волині: пріоритети та перспективи досліджень: матеріали XI Міжнар. конф. (16–17 травня 2017 р.)*. – Луцьк: СНУ ім. Лесі Українки, 2017. – С. 287–289.
12. О.М. Подпалова, **О.П. Мотузіук**, О.Д. Ноздренко. Біомеханічні маркери рівня алкогольної міопатії при хронічній алкоголізації щурів. *Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства*. – Київ, 2019. – С. 52.
13. Д. Ноздренко, Ю. Прилуцький, **О. Мотузіук**. Терапевтичний вплив водного розчину C_{60} фулеренів на скорочення *m. soleus* щурів за умов хронічної алкоголізації. *Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства*. – Київ, 2019. – С. 45.
14. **О.П. Мотузіук**, С.Ю. Зай, О.Д. Ноздренко. Різниця скоротливої активності *m. soleus* алкоголізованих щурів при різних ступенях ішемізації м'яза. *Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства*. – Київ, 2019. – С. 47.
15. **О.П. Мотузіук**, В.С. Пикалюк. Гістологічні особливості *m. gastrocnemius* щура за умов хронічної алкоголізації та ішемії різної тривалості. *Збірник тез VII Конгресу Наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України*. – Одеса, 2019. – С. 68.
16. В.С. Пикалюк, **О.П. Мотузіук**, О.А. Мельничук. Гістологічні особливості *m. gastrocnemius* щура за умов хронічної алкоголізації та ішемії різної тривалості. *Прикладні аспекти морфології експериментальних і клінічних досліджень: матеріали наук.-практ. конф.* – Тернопіль, 2019. – С. 139–140.
17. **О. Motuziuk**, D. Nozdrenko, K. Bogutska, U. Ritter, Yu. Prylutsky. C_{60} fullerene effect on the degree of tremor oscillations of muscle contraction in chronic alcoholic rats. International conference “NANO–2022”, 25–27 August 2022, Lviv. – Kyiv: LLC APF Polygraph Service, 2022. – P. 247.
18. **О. Motuziuk**, D. Nozdrenko, I. Vareniuk, K. Bogutska, Yu. Prylutsky. C_{60} fullerene effect on the mechanokinetics of *muscle gastrocnemius* contraction in chronically alcoholized rats. International conference “NANO–2023”, 16–19 August 2023, Bukovel. – Kyiv: LLC APF Polygraph Service, 2023. – P. 292–293.
19. **О. Motuziuk**, D. Nozdrenko, I. Vareniuk, V. Cherepanov, U. Ritter, Yu. Prylutsky. C_{60} fullerene reduces the level of liver damage in chronic alcohol intoxication of rats. International conference “NANO–2024”, 21–24 August 2024, Uzhgorod. – Kyiv: LLC APF Polygraph Service, 2024. – P. 307–308.
20. **О. Motuziuk**, D. Nozdrenko, N. Tverdokhleba, U. Ritter, Y. Prylutsky. C_{60} fullerene effect on the *musculus gastrocnemius* contraction in chronically alcohol-exposed rats and its mechanism of action. International Research and Practice Conference “Nanotechnologies and Nanomaterials” (NANO–2025): Abstract Book / Edited by Dr. Olena Fesenko. – Bukovel, August 20–23, 2025. – Kyiv: LLC APF Polygraph Service, 2025. – P. 230–231.

АНОТАЦІЯ

Мотузіук О.П. Скоротлива активність скелетних м'язів за хронічної алкогольної міопатії та її корекція водорозчинними C_{60} фулеренами. – Наукова

доповідь (за сукупністю статей).

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2026.

За використання тензометрії, біохімічного та гістологічного аналізів досліджено скоротливу активність скелетних м'язів (швидких і повільних) щурів за хронічної алкогольної міопатії та її корекцію водорозчинними C_{60} фулеренами залежно від дози, схеми (до вживання алкоголю, вживання разом з акоголем і після вживання алкоголю) та перорального застосування.

Уперше на моделях алкоголізованих тварин доведено, що застосування водорозчинних C_{60} фулеренів у терапевтичній схемі введення (пероральна щоденна доза 1 мг/кг разом з алкоголем упродовж 3, 6 і 9 місяців), яка виявилася найбільш ефективною, нормалізує час встановлення гладкого тетануса м'язів, збільшує їх силову відповідь, зменшує «тремор» та подовжує час настання м'язової втоми порівняно з контролем. Біохімічні дослідження крові та м'язової тканини піддослідних тварин засвідчили відновлення показників про- та антиоксидантного балансу та ключових ферментів енергетичного обміну. Гістологічні дослідження підтвердили зниження дистрофічних і некротичних змін у м'язових волокнах за використання водорозчинних C_{60} фулеренів разом з алкоголем. Також виявлено зменшення рівня ферментів-маркерів ураження печінки порівняно з контролем. У печінці спостерігали слабо виражену дрібнокраплинну ліпідну дистрофію гепатоцитів, балонна дистрофія була відсутня, що свідчить про гепатопротекторну дію водорозчинних C_{60} фулеренів.

Уперше в рамках модельних розрахунків показано, що наночастинки C_{60} фулеренів здатні ефективно зв'язувати молекули етанолу, виключаючи їх з метаболічного циклу, і, таким чином, зменшувати негативний вплив алкоголю на організм загалом і скоротливу активність скелетних м'язів зокрема.

Одержані результати свідчать про перспективність використання водорозчинних C_{60} фулеренів-антиоксидантів у терапії алкогольної міопатії та пов'язаних з нею уражень печінки.

Ключові слова: скелетні м'язи; алкогольна інтоксикація; хронічна алкогольна міопатія; біомеханічні параметри скорочення м'яза; біохімічний аналіз; гістологічний аналіз; водорозчинний C_{60} фулерен; антиоксидантна дія; моделювання

SUMMARY

Motuziuk O.P. Contractile activity of skeletal muscles in chronic alcoholic myopathy and its correction by water-soluble C_{60} fullerenes. - Scientific report (based on a collection of published papers).

Dissertation for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences in speciality 03.00.02 - biophysics – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2026.

Using tensometry, biochemical and histological analyses, the contractile activity of skeletal muscles (fast and slow) in rats with chronic alcoholic myopathy and its correction by water-soluble C_{60} fullerenes depending on the dose, regimen (before alcohol

consumption, consumption together with alcohol and after alcohol consumption) and oral administration were investigated.

For the first time, it has been proven in models of alcoholized animals that the use of water-soluble C₆₀ fullerenes in the therapeutic administration regimen (oral daily dose of 1 mg/kg together with alcohol for 3, 6 and 9 months), which turned out to be the most effective, normalizes the time of establishment of smooth muscle tetanus, increases their force response, reduces "tremor" and prolongs the time of onset of muscle fatigue compared to the control. Biochemical studies of the blood and muscle tissue of experimental animals showed the restoration of pro- and antioxidant balance indicators and key enzymes of energy metabolism. Histological studies confirmed the reduction of dystrophic and necrotic changes in muscle fibers with the use of water-soluble C₆₀ fullerenes together with alcohol. A decrease in the level of enzymes-markers of liver damage compared to the control was also found. In the liver, mildly expressed small-droplet lipid dystrophy of hepatocytes was observed, balloon dystrophy was absent, which indicates the hepatoprotective effect of water-soluble C₆₀ fullerenes.

The results obtained indicate that C₆₀ fullerenes, as antioxidants, on the one hand, are able to effectively inactivate reactive oxygen species induced by alcohol intoxication of the body, and on the other hand, activate the protective effect of the antioxidant system in response to the development of this pathology. For the first time, within a calculation model it was shown that C₆₀ fullerene nanoparticles are able to effectively bind ethanol molecules, excluding them from the metabolic cycle, and thus reduce the negative impact of alcohol on the body in general and the contractile activity of skeletal muscles in particular.

Thus, these findings indicate the prospects for the use of water-soluble C₆₀ fullerene-antioxidants in the therapy of alcoholic myopathy and associated liver lesions.

Keywords: skeletal muscles; alcohol intoxication; chronic alcoholic myopathy; biomechanical parameters of muscle contraction; biochemical analysis; histological analysis; water-soluble C₆₀ fullerene; antioxidant action; modeling.