

ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ОМЕЛЬЧУК ОЛЕКСАНДР ЯРОСЛАВОВИЧ

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

**Вплив ін'єкцій C_{60} фулеренів на розвиток рабдоміолізу спричиненого
м'язовою травмою та пов'язаною з нею гострою нирковою недостатністю**

Спеціальність 091 Біологія

Галузь знань 09 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

Науковий керівник: Мотузюк Олександр Петрович, кандидат біологічних наук,
доцент.

ЛУЦЬК – 2025

АНОТАЦІЯ

Омельчук О.Я. Вплив ін'єкцій C_{60} фулеренів на розвиток рабдоміолізу спричиненого м'язовою травмою та пов'язаною з нею гострою нирковою недостатністю.

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

В роботі досліджено біомеханічні, біохімічні та морфологічні зміни, що виникають за м'язових травм, спричинених руйнуванням скелетного м'язу різних ступенів важкості, з подальшим рабдоміолізом і розвитком гострої ниркової недостатності. Фіксація параметрів відбувалася на 1,3,6 і 9 добу після травми. Як терапевтичний агент використано внутрішньочеревні та внутрішньом'язові ін'єкції водорозчинного C_{60} фулерену в концентрації 1 мг/кг. Описано зміни сили скорочення *musculus soleus*, інтегрованої потужності м'язів, рівня креатиніну, креатенінфосфокінази, швидкості клубочкової фільтрації, рівня сечовини та зміну фракційної екстракції натрію. Проаналізовано зміни рівнів про- та антиоксидантного балансу.

В проведених тестах відбувається зміна описаних біомеханічних і біохімічних параметрів приблизно на 27-30% за терапевтичного введення фулерена C_{60} . Встановлено, що найбільший терапевтичний ефект щодо зменшення показника фракційної екскреції натрію має місце при застосуванні водного розчину C_{60} у дозі 2 мг/кг на 9 добу після розвитку рабдоміолізу. Показано, що ін'єкції водного розчину C_{60} у дозі 1 мг/кг знижували вміст ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) у крові щурів в середньому на (13-18)%, а підвищення дози водного розчину C_{60} удвічі (2 мг/кг) сприяла зменшенню рівня ЛПНЩ лише на тяжких стадіях рабдоміолізу. Показано, що за внутрішньочеревному введенні розчину фулерену C_{60} відбувається збільшення швидкості клубочкової фільтрації яке склало 14- 19% при дозі фулерену 1мг/гк та 48 - 51% при збільшенні дози фулерену до 2мг/кг.. Це свідчить про наявність

компенсаторної активації фулереном C_{60} ендогенної антиоксидантної системи в процесі посттравматичних змін *musculus soleus*, спричинених механічним пошкодженням різних ступенів тяжкості. Однак зниження ін'єкціями фулерена рівня рабдоміолізу не може бути єдиною причиною зменшення рівня ниркової недостатності. На нашу думку, C_{60} фулерен може впливати на активність ендогенних антиоксидантів, пригальмовуючи виникнення деструкцій видільної системи, що зменшує рівень гострої ниркової недостатності. Також, можливо припустити про його терапевтичний вплив і на прискорення процесу відновлення пошкоджених рабдоміолізом структур. Позитивна зміна всіх досліджуваних біомеханічних і біохімічних маркерів, що підтверджує можливість застосування водного розчину C_{60} фулеренів як терапевтичного агента, здатного зменшувати й корегувати патологічні стани м'язової та видільної системи, що виникають за посттравматичного рабдоміолізу скелетних м'язів.

Ключові слова: C_{60} фулерен, скелетні м'язи, механокінетичні параметри скорочення, оксидативний стрес, антиоксидантна система, рабдоміоліз, ниркова недостатність, біохімічні показники, щури.

SUMMARY

Omelchuk O.Y. Effect of C60 fullerenes injections on the development of rhabdomyolysis caused by muscle trauma and associated acute renal failure. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in Specialty 091 Biology. Lesia Ukrainka Volyn National University, Voli Avenue 13, Lutsk, Volyn Region

This study examines the biomechanical, biochemical, and morphological changes occurring in musculus injuries caused by varying degrees of skeletal musculus damage, leading to rhabdomyolysis and the subsequent development of acute kidney injury. The parameters were recorded on days 1, 3, 6, and 9 after the trauma. A water-soluble C60 fullerene was used as a therapeutic agent, administered via intraperitoneal injections at a concentration of 1 mg/kg.

The research describes alterations in the contractile force of the musculus soleus, integrated musculus power, creatinine levels, creatine phosphokinase activity, glomerular filtration rate, urea concentration, and fractional sodium extraction. Changes in the levels of pro- and antioxidant balance were also analyzed.

The conducted tests demonstrated that the described biomechanical and biochemical parameters changed by approximately 27-30% following the therapeutic administration of C60 fullerene. It was found that the most significant therapeutic effect in reducing the fractional sodium excretion rate was observed with the administration of an aqueous solution of C60 at a dose of 2 mg/kg on the 9th day after the onset of rhabdomyolysis. The study also showed that injections of an aqueous solution of C60 at a dose of 1 mg/kg reduced low-density lipoprotein (LDL) levels in rat blood by an average of 13-18%, while doubling the dose to 2 mg/kg contributed to a decrease in LDL levels only in severe stages of rhabdomyolysis.

Moreover, intraperitoneal administration of the C60 fullerene solution resulted in an increase in glomerular filtration rate, reaching 14-19% at a fullerene dose of 1 mg/kg and 48-51% when the dose was increased to 2 mg/kg. These findings suggest that C60 fullerene may activate the endogenous antioxidant system as a compensatory response to post-traumatic changes in the musculus soleus, caused by mechanical damage of

varying severity. However, the reduction in rhabdomyolysis due to fullerene injections alone cannot be considered the sole reason for the decrease in kidney failure.

It is hypothesized that C₆₀ fullerene influences the activity of endogenous antioxidants, delaying destructive processes in the excretory system, thereby mitigating the severity of acute kidney injury. Additionally, its therapeutic effect may contribute to the acceleration of recovery processes in structures damaged by rhabdomyolysis. The positive changes in all studied biomechanical and biochemical markers confirm the potential of water-soluble C₆₀ fullerenes as a therapeutic agent capable of reducing and correcting pathological conditions of the muscular and excretory systems arising from post-traumatic skeletal musculus rhabdomyolysis.

Keywords: C₆₀ fullerene, skeletal musculuss, mechanokinetic contraction parameters, oxidative stress, antioxidant system, rhabdomyolysis, kidney failure, biochemical indicators.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Prylutsky, Y., Nozdrenko, D., **Omelchuk, O.**, Ritter, U., Piosik, J. Effect of C₆₀ Fullerene on Musculus Injury-Induced Rhabdomyolysis and Associated Acute Renal Failure. *International Journal of Nanomedicine*, 2024, 19, 8043–8058 10.2147/IJN.S468013 (**Scopus, Q1**)
2. **Omelchuk, O.**, Prylutska, S., Nozdrenko, D., Zholos, A., Prylutsky, Y. C₆₀ fullerene attenuates the signs of acute renal failure in rats under rhabdomyolysis due to inhibition of oxidative stress. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2023, 95(5), 61–75 10.15407/ubj95.05.061 (**Scopus**)
3. **Omelchuk, O.Y.**, Nozdrenko, D.M., Vareniuk, I.M., Mishchenko, I.V., Prylutska, S.V. Evaluation of the Level of Low-Density Lipoproteins in the Blood of Rats with Rhabdomyolytic Renal Failure of Various Severity Degrees and Water-Soluble C₆₀ Fullerenes Action. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, 2023, 21(4), 909–921. doi.org/10.15407/nnn.21.04.909 (**Scopus**)
4. **Omelchuk, O.Ya.**, Nozdrenko, D.M., Motuziuk, O.P., Prylutska, S.V., Zholos, A.V. The impact of water-soluble C₆₀ fullerenes on the course of rhabdomyolysis-induced kidney damage of various severity degrees. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 2023, 69(6), 52–59. doi.org/10.15407/fz69.06.052 (**Scopus**)

Омельчук О.Я., Прилуцька С.В., Ноздренко Д.М., Мотузюк О.П., Варенюк І.М., Богущька К.І., Жолос О.В., Прилуцький Ю.І С₆₀ фулерен послаблює ознаки гострої ниркової недостатності у щурів шляхом пригнічення окисного стресу при рабдоміолізі. Матеріали чергового ІХ з'їзду Українського біофізичного товариства. – Київ, 2023. – С. 80

Ноздренко Д., Омельчук О., Мотузюк О., Сорока В., Нурищенко Н., Гончар О., Франкевич Д., Матвієнко Т., Стецька В., Богущька К., Прилуцький Ю. Вплив водорозчинних С₆₀ фулеренів на викликаний м'язовою травмою рабдоміоліз та пов'язану з ним гостру ниркову недостатність // Матеріали ІХ з'їзду Українського біофізичного товариства. – Київ, 2023. С. 169.

Омельчук О., Мотузюк О., Сорока В. Вплив водного розчину C60 фулеренів на розвиток рабдоміолітичної гострої ниркової недостатності. Scientific Collection «InterConf», (173): with the Proceedings of the 9th International Scientific and Practical Conference «Global and Regional Aspects of Sustainable Development» (October 6-8, 2023; Copenhagen, Denmark) / comp. by LLC SPC «InterConf». Copenhagen: Berlitz Forlag, 2023. 139 p.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	6
ЗМІСТ	8
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	10
ВСТУП	11
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	16
1.1 Етіологія рабдоміолізу	16
1.2 Основні етіологічні фактори рабдоміолізу	19
1.3 Патофізіологічні механізми рабдоміолізу	21
1.4 Патогенез гострого пошкодження нирок за рабдоміолізу	25
1.5. Застосування детоксикації під час лікування рабдоміолізу	28
1.6 Біологічні властивості фулеренів	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	40
2.1 Лабораторні щурі – об’єкт для моделювання ГНН викликаного рабдоміолізом	40
2.2 Хірургічні маніпуляції	42
2.3.Анатомо-гістологічна характеристика musculus soleus	45
2.4 Обладнання	46
2.5 Визначення біохімічних параметрів ГНН індукованою рабдоміолізомі	51
2.6 Вимірювані параметри скорочення musculus soleus	53
2.7 Гістологічний аналіз	55
2.8 Отримання водного розчину фулеренів C ₆₀	55
2.9 Статистична обробка результатів	57
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	59
3.1 Вплив водного розчину фулерену C ₆₀ на розвиток ниркової недостатності викликаного рабдоміолізом пошкодження скелетних м'язів гліцеролової моделі.	59
3.2 Оцінка показників про-та антиоксидантного балансу.	70
3.3 Кореляційний аналіз ступеня ниркової дисфункції	76

3.4 Гістологічний аналіз	83
3.5 Вплив ін'єкцій C ₆₀ фулеренів на розвиток рабдоміолізу, викликаного м'язовою травмою закритого типу і пов'язаною з нею гострою нирковою недостатністю.	87
УЗАГАЛЬНЕННЯ	110
ВИСНОВКИ	113
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	115

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ	аденозиндифосфат
АСМ	атомно-силова мікроскопія
АТФ	аденозинтрифосфат
АЦП	аналого-цифровий перетворювач
АФК	активні форми кисню
ГНН	гостра ниркова недостатність
ДРС	динамічне розсіювання світла
КФК	креатинфосфокіназа
ЛДГ	лактатдегідрогеназа
ЛД	летальна доза
ЛПНЩ	ліпопротеїди низької щільності
ПД	потенціал дії
ПОЛ	перекисне окиснення ліпідів
СР	саркоплазматичний ретикулум
С ₆₀ ФВР	водний розчин С ₆₀ фулерену
ШКФ	швидкість клубочкової фільтрації
GSH	відновлений глутатіон

ВСТУП

Актуальність теми. Рабдоміоліз – це стан, що супроводжується руйнуванням скелетних м'язів і вивільненням їхнього внутрішньоклітинного вмісту в кровотік. У процесі цього руйнування в кров потрапляють електроліти, ферменти та міоглобін, що може викликати різноманітні системні ускладнення. Вплив рабдоміолізу на організм варіюється: у легких випадках він може проявлятися лише підвищеним рівнем м'язових ферментів у крові, тоді як у важких – призводити до гострого ураження нирок (ГНН) або серйозних електролітних порушень [1]. Основною причиною розвитку рабдоміолізу є некроз м'язової тканини, який може виникати як внаслідок травматичних, так і нетравматичних факторів [2]. Органна недостатність, включно з ГНН, є третьою за значущістю причиною смерті після кровотечі та черепно-мозкової травми у пацієнтів із травмами [3]. ГНН, індукована рабдоміолізом, розвивається стрімко і безпосередньо пов'язана зі смертністю у пацієнтів з м'язовими травмами. Фактори ризику на догоспітальному та ранньому госпітальному етапі можуть забезпечити хороші результати лише за умови раннього виявлення рівня ГНН після травми та швидкого клінічного лікування [4].

Причини важкого рабдоміолізу включають розтрощення і розриви м'язових тканин, некроз, тривалу іммобілізацію і важкі інфекції. В умовах бойових дій ГНН, індукована рабдоміолізом, є одним із головних чинників важких ускладнень під час клінічних реабілітаційних процедур. Виявлено тісний зв'язок між смертністю, рівнями розвитку рабдоміолізу та ГНН у поранених у бойових діях, що дає змогу припустити, що вплив рабдоміолізу на смертність може бути опосередкований саме ГНН [5]. Показано, що ГНН часто зустрічається у поранених у бойових діях, у дослідженнях у відділеннях інтенсивної терапії показано, вона спостерігається в 34,3% випадків ушкодження м'язової тканини та істотно підвищує рівень смертності [6]. Однак, навіть після вдалого клінічного лікування рабдоміолізного ушкодження, показано значне збільшення ризику розвитку ГНН після бойової травми та збільшення смертності серед ветеранів бойових дій, які отримали поранення [7]. Показано, що ГНН у

пацієнтів із важкими травмами зустрічається в 50% випадків, що безпосередньо пов'язано з підвищенням рівня їхньої смертності [8]. За результатами деяких досліджень навіть об'ємна і тривала реанімація у відділеннях інтенсивної терапії не є достатньо ефективним засобом для повного відновлення таких пацієнтів [9].

Нещодавні дослідження в загальній популяції пацієнтів, які перебувають у відділенні інтенсивної терапії, показують прогрес у ранній ідентифікації ГНН при м'язових травмах та її медикаментозній терапії, проте наразі профілактичні та підтримувальні стратегії залишаються основою лікування ГНН після травми [10]. Діагноз ГНН встановлюють за підвищенням рівня сироваткових м'язових ферментів і м'язових компонентів, таких як креатинінфосфокіназа і міоглобін. Однак, ці маркери є і показниками м'язової травми, що істотно ускладнює процедуру точної ідентифікації рівнів ГНН за тяжких травм м'язової системи.

Профілактичні заходи включають підтримання нормального або високого внутрішньосудинного об'єму і призначення діуретиків після досягнення гіперволемії. Деякі дані свідчать про те, що ранній початок замісної ниркової терапії може допомогти поліпшити результат [11]. Хоча безперервна замісна ниркова терапія (безперервний артеріовенозний гемодіаліз) може принести певну користь людям із рабдоміолізом, низька методологічна якість досліджень і відсутність даних, що стосуються клінічно важливих результатів, обмежили висновки про її ефективність [11]. Таким чином, висока частота ГНН у пацієнтів із м'язовими травмами повинна коригуватися раннім виявленням осіб, схильних до ризику ГНН, для розробки стратегії реанімації, спрямованої на запобігання ГНН і раннього медикаментозного лікування.

Показано, що різні ендогенні та синтетичні антиоксиданти суттєво впливають на перебіг ГНН, індукованого рабдоміолізом [12,13,14]. Враховуючи, що однією з ключових ланок ушкодження ниркового епітелію при ГНН є пероксидація ліпідів, можна припускати ефективне лікувальне застосуванням антиоксидантних препаратів. Одним із таких прикладів є C_{60} фулерени, які можуть ефективно захоплювати та нейтралізувати вільні радикали в системах *in vivo* та *in vitro* [15,16]. Дослідження показали, що введення біосумісних

водорозчинних C_{60} фулеренів [17] після початку пошкодження скелетного м'яза сприяє значним позитивним терапевтичним ефектам [18,19]. Отже, дослідження, спрямовані на раннє виявлення ГНН та покращення методів медикаментозного лікування на ранніх етапах надання допомоги при травмах є найважливішим завданням. Все це стало основою для дослідження впливу водного розчину C_{60} фулеренів на розвиток процесів гострої ниркової недостатності щурів на тлі рабдоміолізу *musculus soleus* при ін'єкціях розчину C_{60} фулеренів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційне дослідження проведено в межах наукової роботи кафедри біофізики та медичної інформатики на тему «Біофізичні механізми функціонування та регуляції скелетних і гладеньких м'язів у нормі та за патологічних станів, а також розробка методів їх корекції» (№ 20КФ036-01). Крім того, робота є складовою частиною науково-технічного (експериментального) проекту МОН України «Створення технології використання водорозчинних C_{60} фулеренів для зменшення втоми скелетних м'язів» (№ державної реєстрації 0121U109986).

Метою роботи було дослідити вплив дії C_{60} фулеренів, як антиоксидантів, на розвиток ГНН індукованої рабдоміолізним та гліцероловим ушкодженням м'язової тканини різних ступенів тяжкості.

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

1. порівняти рівні змін механокінетичних параметрів скорочення *musculus soleus* щурів та біохімічні маркери гострої ниркової недостатності після механічної травми м'яза 1, 2 та 3 ступеня важкості на 1, 3, 6 та 9 добу після травмування та за дії ін'єкцій водорозчинних C_{60} фулеренів.

2. порівняти моделі гліцеролової травми на 3, 6 та 9 добу після введення розчину гліцерину у 3-х дозах: 5, 10 і 15 мг/кг ваги тварини та за умов введення водного розчину C_{60} фулерену.

3. проаналізувати кореляцію між біомеханічними відповідями скорочення м'язів та біохімічними показниками крові щурів з метою аналізу рівня терапевтичного впливу водного розчину C_{60} фулерену на розвиток

індукованої рабдоміолізом гострої ниркової недостатності крові щурів через 1 місяць відновлення.

Об'єкт дослідження: Процеси розвитку гострої ниркової недостатності, асоційованої з рабдоміолізом, спричиненим м'язовою травмою.

Предмет дослідження: механокінетичні параметри скорочення *musculus soleus* та біохімічні показники плазми крові щурів у разі розвитку гострої ниркової недостатності та впливу водорозчинних C_{60} фулеренів.

У роботі були застосовано такі методи: атомно-силова мікроскопія, хірургічні та стереотаксичні методи виділення нервово-м'язового препарату, тензометричні методи, динамічне розсіювання світла, біохімічний аналіз плазми крові, статистичний аналіз даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Виявлено позитивні зміни всіх досліджуваних біомеханічних і біохімічних маркерів, що підтверджує можливість використання водного розчину C_{60} фулеренів як терапевтичного засобу для зменшення та корекції патологічних станів м'язової та видільної системи, які виникають унаслідок посттравматичного рабдоміолізу скелетних м'язів. Ці результати відкривають нові перспективи у лікуванні патологічних станів, пов'язаних із негативним впливом вільнорадикальних процесів.

Практичне значення одержаних результатів. Виходячи з отриманих даних, можна стверджувати, що позитивна зміна всіх досліджуваних біомеханічних і біохімічних маркерів підтверджує можливість застосування водного розчину C_{60} фулеренів як терапевтичного агента, здатного зменшувати й коригувати патологічні стани м'язової та видільної системи, що виникають у разі травм скелетних м'язів. Окремі положення дисертаційної роботи та методи досліджень можуть бути впроваджені у навчальний процес на біологічних факультетах університетів та медичних вузів при розробці курсу з вивчення біомеханічних та біохімічних аспектів патологічних станів.

Особистий внесок здобувача. Участь у формулюванні мети і завдань роботи, аналіз та обробка літературних даних, виконання експериментальних досліджень, статистичний аналіз отриманих результатів, узагальнення

отриманих даних, формулювання висновків роботи за участю наукового керівника та співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Одержані результати дисертації були апробовані на міжнародних конференціях, зокрема " Translational Biomedical Research" (Kyiv, 2023), " Global and Regional Aspects of Sustainable Development " (2023), а також на наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин Волинського національного університету імені Лесі Українки.

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

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення та висновків. Дисертаційну роботу викладено на 129 сторінках тексту. Вона містить 2 таблиці, 38 рисунків. Перелік використаної літератури включає 165 найменувань.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Етіологія рабдоміолізу.

Під рабдоміолізом розуміють клініко-лабораторний синдром, що розвивається внаслідок ушкодження та деструкції міоцитів поперечносмугастої м'язової тканини, що супроводжується вивільненням продуктів міолізу, потраплянням їх у системний кровообіг і формуванням токсемії різного ступеня вираженості [21]. Найпоширенішою та найнебезпечнішою органною дисфункцією при розвитку рабдоміолізу є гостра ниркова недостатність (ГНН), що являє собою варіант гострого ушкодження нирок, що розвивається при масивному міолізі в результаті клубочкової фільтрації міоглобіну із системного кровотоку і проникнення його в ниркові каналці з подальшою їх обструкцією [22].

Теоретично будь-яка форма пошкодження м'язів може привести до рабдоміолізу. До найпоширеніших причин належать:

- механічна травма або м'язова ішемія (травма з розтрощенням тканин, ураження електричним струмом, або синдром тривалого стиснення);
- ліки, наркотичні препарати і токсини (наприклад, статини, антибіотики, анксиолітики, нейролептики, кокаїн, амфетаміни, алкоголь);
- інфекція (наприклад, грип А і В, вірус Коксаки, *Staphylococcus aureus*).

Менш поширені причини включають:

- електролітні порушення (наприклад, гіпокаліємія, гіпофосфатемія);
- ендокринні розлади (наприклад, діабетичний кетоацидоз і некетотична гіперглікемія);
- генетичні порушення (наприклад, дистрофія Дюшенна, м'язова дистрофія Беккера);
- надмірне фізичне навантаження або тривала іммобілізація;

- екстремальна температура тіла (наприклад, гіпотермія, гіпертермія при злоякісному нейролептичному синдромі або злоякісна гіпертермія, а також тепловий удар).

Рабдоміоліз, на відміну від інших термінологічних одиниць (міопатія, міалгія, міозит), характеризується наявністю м'язових симптомів, що супроводжуються значним підвищенням рівня креатинфосфокінази (КФК) (перевищення нормальних значень більш ніж 11 у 10 разів), а також підвищення рівня креатиніну, появу міоглобінурії та пігментного забарвлення сечі [23,24].

Дані про поширеність рабдоміолізу суперечливі, що пов'язано з певними проблемами діагностики, відсутністю чітких уніфікованих критеріїв визначення даного синдрому, залученістю фахівців різних медичних профілів до лікування рабдоміолізу залежно від причини його розвитку. Тому наявні в літературі дані про частоту рабдоміолізу, що становить 26-120 випадків на 100 тис. населення на рік [25,26] і можуть бути заниженими і варіювати в різних країнах залежно від поширеності факторів ризику в популяції. Найбільше поширення рабдоміолізу зазначеної етіології характерне для військовослужбовців, особливо військовослужбовців за призовом. За даними низки авторів, рабдоміоліз виявляють у 20 призовників зі 100 тис. на рік [27].

Частота розвитку ГНН при рабдоміолізі становить від 10 до 55% [28, 29]. При цьому серед усіх причин розвитку ГНН частка рабдоміолізу дорівнює 5-25% [30,31]. Летальність серед пацієнтів із рабдоміолізом, ускладненим ГНН, досягає 10% [32, 33]. Слід зазначити, що найбільша кількість випадків рабдоміолізу, ускладненого розвитком ниркової недостатності, спостерігається під час великих природних стихійних лих. Виражений ступінь рабдоміолізу з розвитком ГНН характерний для важких травм опорно-рухового апарату з пошкодженням великих м'язових масивів [34,35]. При цьому суттєве значення для виникнення ускладнень має пізнє надання спеціалізованої медичної допомоги при порушеннях логістичних ланцюгів евакуації тих, хто вижив. Своєчасно надана медична допомога, грамотне і кваліфіковане проведення лікування на

догоспітальному етапі, покращують результати захворювання і знижують вартість лікування [36,37].

Рабдоміоліз, який виникає внаслідок краш-синдрому, тривалого здавлювання або механічної травми скелетної мускулатури, являє собою процес руйнування поперечно-смугастих м'язів. Це супроводжується ушкодженням сарколеми та вивільненням продуктів клітинного розпаду у системний кровотік. Такий стан є предметом особливої уваги з боку анестезіологів-реаніматологів, оскільки часто супроводжує важкі травми, включаючи дорожньо-транспортні пригоди, падіння з висоти або виробничі інциденти. В останні роки проблема набула ще більшої актуальності через збільшення кількості поранених із мінно-вибуховими ушкодженнями, що надходять із районів бойових дій на сході України. Механізм розвитку рабдоміолізу при подібних травмах полягає у масивному пошкодженні м'язової тканини, руйнуванні сарколеми та надходженні до крові продуктів розпаду клітин, таких як електроліти, креатинфосфокіназа, альдолаза, лактатдегідрогеназа, аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза. Одним із основних факторів у цьому процесі є міоглобін.

У результаті прямої травми м'язової оболонки або порушення енергетичного обміну з дефіцитом АТФ у м'язових клітинах виникає надлишок внутрішньоклітинного кальцію. Це спричиняє тривале скорочення м'язових волокон, виснаження запасів АТФ, активацію кальційзалежних ферментів – протеаз та фосфоліпаз, які спричиняють розпад м'язових волокон, елементів цитоскелету та білків мембран, що призводить до загибелі м'язових клітин.

Затримка рідини в ушкоджених м'язах спричиняє зниження об'єму циркулюючої крові (гіповолемію) та активує симпатичну нервову систему, секрецію антидіуретичного гормону та ренін-ангіотензинову систему, що призводить до звуження судин у нирках (вазоконстрикції). Потрапляння міоглобіну у кровотік зумовлює розвиток гострого ураження нирок. Міоглобін, з одного боку, викликає ушкодження ниркових каналців через утворення вільних радикалів, а з іншого – у кислому середовищі сечі утворює з Тамм-

Horsfall білком (уринарним глікопротеїном, що продукується клітинами дистальних каналців) нерозчинні комплекси, які обструкціюють просвіт ниркових каналців і ускладнюють фільтрацію.

1.2. Основні етіологічні фактори рабдоміолізу

Існують різні класифікації рабдоміолізу залежно від основної причини розвитку: травматичний і нетравматичний, спадково зумовлений і набутий тощо. [40,41,42,43]. Однією з найпоширеніших причин рабдоміолізу є синдром тривалого здавлення (краш-синдром), що супроводжується компресією м'язових масивів із подальшою реперфузією. Подібний механізм рабдоміолізу спостерігається у постраждалих унаслідок стихійних лих, нещасних випадків, збройних конфліктів [44,45,46,47,48,49]. Компресія м'язових масивів та їхня ішемія характерні для синдрому позиційного здавлення, що розвивається під час тривалого перебування в вимушеному положенні, що найчастіше спостерігається у хворих на тлі пригнічення свідомості, зокрема токсичного та медикаментозного генезу, при довготривалих хірургічних операціях, під час застосування ортопедичних і фіксувальних пов'язок [50,51]. Досить поширеною причиною рабдоміолізу, особливо в осіб працездатного віку, є надмірно інтенсивні фізичні навантаження. Постнавантажувальний рабдоміоліз найчастіше розвивається в недостатньо тренуваних осіб у результаті незвичного для них м'язового напруження. Додатковими провокуючими факторами постнавантажувального рабдоміолізу нерідко виступають гіпертермія, дегідратація та підвищена вологість навколишнього середовища. Гіпокаліємія також потенціює розвиток пошкодження м'язової тканини під час фізичних навантажень, що зумовлено спазмом м'язових судин та ішемією при нестачі калію, який має виражений вазодилатуючий ефект [52,53,54,55,56]. Описано випадки м'язового пошкодження на тлі астматичного статусу, коли виражене фізичне напруження спільно з гіпоксемією та міотоксичною дією кортикостероїдів призводять до рабдоміолізу [57, 58]. У низці випадків рабдоміоліз розвивається внаслідок оклюзії артерій, що кровопостачають м'язи,

внаслідок емболії, тромбозу або механічного перетискання. Як правило, у подібних ситуаціях час обструкції судини становить не менше 4 годин, що достатньо для некрозу м'язової тканини. Необхідно зазначити, що клінічно значуща ГНН розвивається на тлі повної оклюзії магістральних артерій, що призводить до тотального некрозу м'язових тканин, як мінімум, однієї кінцівки [59].

Гіпертермія може бути не тільки основною причиною некрозу міоцитів, а й додатковим чинником його розвитку за низки патологічних станів [60,61]. Значне підвищення температури тіла, здатне викликати рабдоміоліз, спостерігається при злоякісній гіпертермії, що являє собою досить рідкісне генетично обумовлене захворювання, що розвивається у схильних осіб у відповідь на введення галогеновмісних інгаляційних анестетиків або сукциніл анестетиків або сукцинілхоліну. Іншим прикладом деструктивного впливу гіпертермії на м'язову тканину є злоякісний нейрорептичний синдром, який спостерігається в низці випадків при застосуванні нейрорептиків [62]. Електричні ураження призводять до рабдоміолізу приблизно в 10% випадків. При цьому пошкодження міоцитів пов'язують із деструкцією мембран сарколеми в результаті електричного або термічного впливу, що призводить до порушення бар'єрної функції та переміщення іонів кальцію в клітини [63]. Імовірність розвитку міотоксичного ефекту збільшується при комбінованому застосуванні інгібіторів гідроксиметилглутарилу СоАредуктази з гемфіброзілом [64,65]. Ізольований прийом фібраторів також може стати причиною клінічно вираженого рабдоміолізу, що найбільш характерно для хворих, які мають знижену швидкість клубочкової фільтрації, оскільки ці препарати кумулюються при погіршенні видільної функції нирок [66,67].

Процес розвитку рабдоміолізу за гострої або хронічної інтоксикації алкоголем і різними наркотичними речовинами [68], пов'язаний із реалізацією низки потенціюючих механізмів, основними серед яких є: прямий міотоксичний вплив, ажитація, позиційне здавлювання на тлі пригнічення свідомості, гіпокаліємія, гіпофосфатемія. Подібне поєднання різних етіологічних чинників

характерне також для рабдоміолізу, що виникає на тлі прийому психотропних препаратів, у хворих із делірієм і психомоторним збудженням, що вимагає примусової фіксації [69,70]. До істотно більш рідкісних причин розвитку токсичного рабдоміолізу належить вживання в їжу деяких видів риб або м'яса перепелів, а також укуси змій і комах (шершні, отруйні павуки) [71,72,73]. Значущим етіологічним чинником, що реалізується, крім іншого, і при токсичному генезі рабдоміолізу, є різні порушення електролітного складу крові: гіпокаліємія, гіпофосфатемія, гіпер- і гіпонатріємія, гіпокальціємія. Так, однією з причин розвитку міопатії в разі алкогольної інтоксикації є виникнення електролітного дисбалансу у вигляді гіпокаліємії або в вигляді гіпокаліємії і гіпофосфатемії. При цьому етіологічну роль цих чинників досить складно виявити в клінічних умовах, оскільки вони купіруються безпосередньо після пошкодження м'язових масивів і розвитку ГНН [74,75]. Відносно більш рідкісними причинами рабдоміолізу видаються міопатії інфекційного генезу, розвиток яких може бути пов'язаний як із виникненням локальної інвазивної інфекції, прикладом якої є поліміозит, так і з метастатичним дифузним інфекційним ураженням на тлі тяжкого перебігу септичного процесу, бактеріємії або вірусного процесу [76,77,78,79].

1.3. Патофізіологічні механізми рабдоміолізу.

Більшість сучасних авторів описують три основні механізми патогенезу рабдоміолізу: порушення метаболізму міоцитів, реперфузійне пошкодження, розвиток компартмент-синдрому [80,81]. Процеси порушення внутрішньоклітинного метаболізму виникають унаслідок значного збільшення надходження натрію, води та хлоридів у саркоплазму міоцита на тлі впливу пошкоджувальних чинників, що супроводжується набуханням і руйнуванням клітин. Крім цього, важливе значення мають порушення метаболізму кальцію, який потрапляє всередину міоцита в обмін на внутрішньоклітинний натрій. Підвищення концентрації кальцію в клітині призводить до її персистуючого

скорочення, що супроводжується розвитком енергодефіциту і подальшої загибелі міоцита.

Ще один пошкоджувальний механізм впливу високої концентрації внутрішньоклітинного кальцію пов'язаний з активацією фосфоліпази A_2 та інших вазоактивних сполук і протеаз, а також з потенціюванням вивільнення активних форм кисню. Ці процеси призводять до прогресування запальних реакцій, що супроводжуються посиленням міолізу [82,83].

Велике значення в патогенезі розвитку рабдоміолізу надається реперфузійному пошкодженню м'язової тканини. Ця обставина пов'язана з тим, що при гострому і тривалому порушенні кровопостачання основні деструктивні процеси в міоцитах відбуваються не внаслідок ішемії, а вже на тлі відновлення кровотоку в ділянці ураження за рахунок механізму реперфузії. При цьому спостерігається не тільки міграція лейкоцитів до пошкоджених тканин, а й відновлення доставки кисню, що, своєю чергою, супроводжується значним підвищенням рівня чергу, супроводжується значним підвищенням вивільнення вільних радикалів. Патогенетична роль реперфузії в розвитку м'язового пошкодження характерна і для травматичного, і для нетравматичного видів рабдоміолізу [84,85].

Компартмент-синдром також є одним із ключових патофізіологічних механізмів розвитку рабдоміолізу. Можливість реалізації цього механізму пов'язана з особливостями розташування багатьох поперечно-смугастих м'язів, що полягають у їх знаходженні в просторах, обмежених кістковими, фасціальними та іншими структурами. Під час впливу пошкоджувальних чинників відбувається набухання міоцитів унаслідок порушення функції трансцелюлярних енергозалежних насосних систем, що призводить до неконтрольованого підвищення тиску в замкнутому просторі м'язового ложа. Дана обставина зумовлює збільшення вираженості пошкодження міоцитів і некрозу м'язової тканини. Доведено, що підвищення тиску в замкнутому м'язовому колі понад 30 мм рт. ст. є причиною розвитку вираженої ішемії м'язів, причому за наявності у пацієнта гіпотензії важке порушення перфузії м'язової

тканини може розвинутися і за менших значеннях внутрішньофасціального тиску. Необхідно враховувати, що тривале здавлення м'язів може призвести до незворотного пошкодження структур периферичної нервової системи [86,87].

Патогенез системних ускладнень рабдоміолізу пов'язаний із вивільненням продуктів міолізу в кровотік, що призводить до розвитку або посилення ендогенної інтоксикації. Фактори ендогенної інтоксикації чинять виражений системний ушкоджувальний вплив, провокуючи розвиток органних дисфункцій, найчастішою з яких є ГНН [88,89,90]. Поява некротичних змін у пошкоджених м'язових тканинах супроводжується виникненням місцевих запальних процесів, які є причиною накопичення в м'язах значної кількості рідини, об'єм якої за масивного ураження може досягати 10 літрів. У разі відсутності своєчасного й адекватного поповнення цих втрат є високий ризик розвитку таких життєзагрозливих станів, як гіповолемічний шок і ГНН. З іншого боку, у пізніший період перебігу рабдоміолізу після відновлення кровотоку в ушкоджених м'язах вода, що вивільняється, переміщується в інтерстиціальний простір і в судинне русло, що може призвести до гіперволемії в умовах збереження ГНН [91,92].

Важливим патогенетичним аспектом перебігу рабдоміолізу є розвиток метаболічного ацидозу внаслідок вивільнення органічних кислот у результаті деструкції міоцитів. Ацидоз, що формується, посилює порушення багатьох метаболічних процесів в організмі та призводить до прогресування гіперкаліємії та ниркової недостатності. Так, внутрішньоканальцевий ацидоз і зниження рН сечі є чинниками, потенціюють преципітацію міоглобіну та сечової кислоти в ниркових каналцях [93,94].

Суттєвим чинником розвитку рабдоміолізу є порушення метаболізму, пов'язані з дисбалансом електролітів. Для початкового періоду рабдоміолізу характерне накопичення в м'язових тканинах кальцію, що може призводити до утворення масивних кальцинатів у ділянці некрозу м'язів, а також формування гетеротопічної осифікації. На тлі прогресування гіперкаліємії відбувається зниження рівня кальцію в крові, що може спричинити розвиток

життєзагрозливих аритмій, а також супроводжується високим ризиком розвитку судом і спазмів м'язів, що призводять до посилення їхнього пошкодження. Перебіг пізнішого періоду супроводжується вивільненням кальцію з депо, що є причиною розвитку гіперкальціємії. Подібна ситуація найхарактерніша для пацієнтів, у лікування яких застосовували препарати кальцію на початковій стадії патологічного процесу.

Деструкція міоцитів супроводжується вивільненням у системний кровотік фосфору, що призводить до значного підвищення його концентрації в крові на тлі недостатності функції нирок, що розвивається. Ці процеси призводять до формування в тканинах кальцій-фосфорних депозитів. Крім цього, гіперфосфатемія є причиною інгібування ферменту 1 α -гідроксилази, який забезпечує синтез кальцитріолу - активного аналога вітаміну В, що також призводить до гіпокальцемії в дебюті розвитку рабдоміолізу. На тлі масивного руйнування міоцитів відбувається переміщення в системний кровообіг значної кількості іонів калію, що в поєднанні з ГНН, яка формується, призводить до розвитку небезпечної для життя гіперкаліємії, вираженість якої істотно вища при травматичному генезі рабдоміолізу [95,96].

Руйнування ядер міоцитів під час їхньої деструкції супроводжується вивільненням нуклеозидів, які надходять до системного кровотоку після відновлення кровопостачання пошкоджених тканин. У результаті метаболізму в печінці нуклеозиди перетворюються на пурини та сечову кислоту, яка сприяє розвитку обструкції ниркових каналців. Руйнування м'язової тканини призводить до переміщення в кровотік одного з основних її компонентів - креатину, що забезпечує доставку клітинам енергії. Із креатину утворюється креатинін, що є причиною вищого рівня останнього в крові в пацієнтів із ГНН, спричиненим рабдоміолізом, порівняно з випадками ниркової недостатності іншої етіології [97,98,99].

1.4. Патогенез гострого пошкодження нирок при рабдоміолізі

ГНН є найчастішим системним життєзагрозливим ускладненням рабдоміолізу, що багато в чому визначає результат патологічного процесу [100]. Нині виділяють три основні патофізіологічні механізми розвитку ГНН за рабдоміолізу [101]:

- констрикція ниркових судин,
- утворення циліндрів у ниркових канальцях,
- прямий цитотоксичний вплив гема.

Одним із найбільш патогенетично значущих агентів для розвитку ГНН за рабдоміолізу є міоглобін, який у процесі фільтрації вільно проникає крізь гломерулярну базальну мембрану і накопичується в ниркових канальцях. У результаті реабсорбції води відбувається підвищення концентрації міоглобіну в канальцях, що призводить до його преципітації та осадження з формуванням циліндрів, які обтурують просвіт канальців. Патогенетична роль міоглобіну в розвитку ГНН, крім іншого, пов'язана з його здатністю потенціювати спазм гладкої мускулатури. Реалізація цієї властивості є однією з причин ниркової вазоконстрикції, що, поряд із дегідратацією, зумовлює підвищення реабсорбції води і зниження току рідини по ниркових канальцях. Ці чинники посилюють процес осадження міоглобіну в просвіті канальців [102,103,104]. Крім міоглобіну, до обструкції ниркових канальців призводить утворення в їхніх просвітах кристалів сечової кислоти на тлі значного підвищення її продукції та екскреції із сечею за умови масивного пошкодження м'язових тканин. Важливим фактором, що потенціює процес преципітації сечової кислоти і міоглобіну, видається розвиток внутрішньоканальцевого ацидозу. Зниження рН сечі асоційоване з більш вираженим процесом утворення циліндрів у канальцях.

Істотне значення для виникнення ниркового ушкодження має вивільнення вільного заліза в результаті руйнування міоглобіну, що знаходиться в канальцях. Утворене залізо, своєю чергою, провокує розвиток перекисного окиснення ліпідів і формування вільних радикалів, які чинять цитотоксичний вплив на ниркові канальці. Внутрішньоканальцевий ацидоз збільшує нестабільність високореактивного залізо-міоглобінового комплексу [105,106]. Дегідратація, що

розвивається на початкових стадіях рабдоміолізу, може бути причиною системної гіперперфузії, яка призводить до ішемії кишечника, що супроводжується транслокацією мікроорганізмів у системний кровообіг, розвитком ендотоксинемії та цитокінемії. Септичний шок, що формується в результаті цих патогенетичних процесів, призводить до погіршення перфузії нирок і прогресування ГПН [107].

Класичне ураження нирок за рабдоміолізу являє собою розвиток нефропатії та мікросудинного ускладнення, яке характеризується розвитком вузликового або дифузного гломерулосклерозу. Клінічно проявляється розвитком протеїнурії, артеріальної гіпертонії, набряками і зниженням фільтраційної функції нирок, що призводить у підсумку до термінальної стадії ГНН, яка потребує ЗНТ. Безсумнівно, гіперглікемія є провідною причиною розвитку всіх судинних ускладнень ГНН, ініціюючи такі реакції, як оксидативний стрес, неферментативне глікозилювання білків, поліоловий шлях окиснення глюкози, що в подальшому провокує розвиток патологічних змін у нирках. Також патологічний вплив відбувається опосередковано через внутрішньониркову гемодинаміку: гіперглікемія сприяє дилатації привідної артеріоли, внаслідок чого розвивається гіперперфузія нирки.

Підсумком внутрішньоклубочкової гіпертензії стає висока проникність базальних мембран для різних компонентів плазми (білків, ліпідів), які відкладаються в міжкапілярному просторі, провокуючи гіперпродукцію прозапальних цитокінів, що стимулює мезангіальні клітини клубочків нирок, збільшує вироблення колагену IV типу, підсумком стає розвиток гломерулосклерозу. Гіперглікемія як фактор ризику розвитку ушкодження ниркових структур наразі не обговорюється, найважливіше значення компенсації вуглеводного обміну було неодноразово підтверджено в багатьох широкомасштабних дослідженнях. Спільно з гіперглікемією значний вплив на розвиток ГНН чинять зміни в ліпідному спектрі. Дисліпідемія при ГНН характеризується: збільшенням швидкості утворення та концентрації ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), зниженням ліпопротеїнів високої

щільності (ЛПВЩ), гіпертригліцеридемією, підвищеним вмістом вільних (неестерифікованих) жирних кислот. Гломерулопатія, асоційована з рабдоміолізом, являє собою один із варіантів ураження нирок, що характеризується гломерулярною гіпертрофією та формуванням адаптивного вогнищевого сегментарного гломерулосклерозу, які розвиваються на тлі дезадаптації подоцитів під час інсулінорезистентності. Клубочок збільшується у відповідь на спричинене рабдоміолізом збільшення ШКФ, потоку ниркової плазми, фракції фільтрації та каналцевої реабсорбції натрію. Порушення внутрішньониркової гемодинаміки - розвиток «гіперфільтраційної» нирки супроводжується ушкоджувальним впливом гормонів жирової тканини (гіперлептинемією, зниженням продукції адипонектину); з ектопічними відкладеннями ліпідів у нирці. Морфологічна картина ГНН характеризується низькою щільністю клубочків у нирці (олігонекронією), яка призводить до гіпертрофії ниркових клубочків і каналців; розвитком перихілярного фокальносегментарного гломерулосклерозу, вираженими ушкодженнями подоцитів і розвитком «жирової» нирки. Клінічна картина ГНН характеризується повільним і поступовим розвитком альбумінурії, що не перевищує стадії А3 (300-1999 мг/добу). Приблизно в 1/3 хворих розвивається неповний нефротичний синдром із масивною протеїнурією, але без набряків і гіпопротеїнемії.

Таким чином, змінений метаболізм жирних кислот і холестерину дедалі частіше визнають у ролі ключових медіаторів накопичення ниркових ліпідів, запалення, окислювального стресу та фіброзу при розвитку ГНН.

У контролі судинного тону велике значення має ендотелій. Він забезпечує регуляцію просвіту судини залежно від швидкості кровотоку та системного тиску. При тривалому ушкоджувальному впливі гіперглікемії, гемодинамічному перевантаженні виникає дисфункція ендотелію. Основним проявом якої є зниження експресії ендотеліальної NO-синтетази, порушення біодоступності NO, на поверхні ендотеліальної клітини підвищується активність ангіотензинперетворювального ферменту, зростає синтез чинників вазоконстрикції: ангіотензину II, ендотеліну та ін. Поступово відбувається

виснаження компенсаторних вазодилатуючих можливостей ендотелію, і вазоконстрикція спільно з проліферацією стають його основними відповідями на зовнішні стимули. За ГНН сукупність чинників активності протеїнкінази C, процесів неферментного глікування білків, гіперпродукції вільних радикалів спричиняє глибоке ушкодження ендотелію, сприяючи ініціації та прогресуванню мікроангіопатій. Це зумовлено порушеннями внутрішньо ниркової гемодинаміки, що призводять до внутрішньоклубочкової гіпертензії, яка розвивається в пацієнтів із ГНН на ранніх стадіях захворювання. Ці зміни за незадовільної компенсації вуглеводного обміну можуть призводити до розвитку як ушкодження нирок, так і прогресування ГНН.

Таким чином, ендотеліальної дисфункції є потужним фактором розвитку і прогресування ураження нирок; адекватна корекція ендотеліальної дисфункції знижує частоту розвитку мікро- і макросудинних ускладнень у пацієнтів із ГНН.

1.5. Застосування детоксикації під час лікування рабдоміолізу

Провідне патофізіологічне значення численних чинників ендогенної інтоксикації, що надходять у системний кровообіг під час ушкодження м'язової тканини, на тлі неспроможності власних органів детоксикації, яка розвивається під час розвитку рабдоміолізу, зумовлює актуальність питання штучного видалення патогенетично значущих агентів. Для вирішення цього завдання в даний час застосовують різні методи, ефективність використання яких на різних етапах перебігу патологічного процесу широко обговорюється в сучасних літературних джерелах.

Найпоширенішими методиками екстракорпоральної детоксикації застосовуваними при лікуванні рабдоміолізу, є різні модифікації замісної ниркової терапії (ЗНТ) [108,109]. У більшості випадків ЗНТ у пацієнтів із рабдоміолізом проводять після виникнення ГНН з метою заміщення функції нирок і запобігання прогресуванню їхнього ушкодження численними факторами ендогенної інтоксикації. Концепція, що передбачає застосування ЗНТ до розвитку клінічно значущого ГНН з метою його запобігання, нині не набула

поширення через відсутність доказів її ефективності. У сучасних літературних джерелах описано випадки використання різних методів ЗНТ, заснованих як на конвекційних або дифузійних видах масопереносу, так і на їхньому поєднанні, у складі інтенсивної терапії рабдоміолізу, ускладненого ГНН. При цьому принциповим фактором, що дає змогу забезпечити запобігання прогресуванню ушкодження нирок, є можливість елімінації із системного кровотоку міоглобіну, що має молекулярну масу 17,8 кДа.

Таким чином, застосування гемодіалізу з використанням стандартних діалізаторів, розрахованих на видалення низькомолекулярних токсинів, не може вирішити це завдання [110,111,112]. З метою одночасного досягнення всіх завдань застосування ЗНТ для лікування пацієнтів із рабдоміолізом, ускладненим розвитком ГНН, тобто купірування порушень водно-електролітного балансу, кислотно-основного стану, зниження вираженості азотемії та забезпечення ефективної елімінації міоглобіну, сучасні автори пропонують застосування таких методів ЗНТ, як гемофільтрація та гемодіафільтрація, а також гемодіаліз із застосуванням надвисокопроникних мембран. При цьому найпринциповішим аспектом, що впливає на вибір конкретної методики та забезпечує її ефективність, вважається значення показника кліренсу міоглобіну, яке, багато в чому, залежить від точки відсікання (*cut-off point*) мембрани гемофільтра і визначається діаметром її пор [113,114]. Описані результати дослідження, спрямованого на порівняння показників ефективності видалення міоглобіну із системного кровотоку пацієнта з рабдоміолізом, ускладненим розвитком ГНН, у разі застосування тривалої гемофільтрації із застосуванням двох різних гемофільтрів: стандартного полісульфонового із точкою відсікання 20 кДа та надвисокопроникного із точкою відсікання 100 кДа. Були відзначені істотно вищі значення показників коефіцієнта просіювання, кліренсу і ступеня редукції сироваткового міоглобіну в результаті застосування гемофільтра з надвисокопроникною мембраною [115]. Ефективність використання гемофільтрації як методу ЗНТ, що забезпечує досить високий ступінь елімінації міоглобіну, під час лікування ГНН, що ускладнило

перебіг рабдоміолізу. За даними сучасних авторів, метод вено-венозної гемодіафільтрації, що поєднує в собі конвекційний і дифузійний механізми масопереносу, також має істотний потенціал для ефективного видалення міоглобіну. Значення показників кліренсу і ступеня зниження концентрації міоглобіну крові при застосуванні гемодіафільтрації для лікування пацієнтів із рабдоміолізом вищі, ніж при гемофільтрації з використанням аналогічних масообмінних пристроїв. Ця обставина пов'язана саме з поєднанням двох різних механізмів масопереносу, реалізація яких у разі застосування високо- і надвисокопоточних гемофільтрів зумовлює ефективніше видалення міоглобіну із системного кровотоку [116,117].

Також описано випадки успішного застосування інтермітуючого гемодіалізу з використанням подібних діалізаторів, що супроводжувався високим екстракорпоральним кліренсом міоглобіну [118]. Узагальнюючи дані представлених у літературі досліджень, можна зробити висновок, що гемодіафільтрація є найліпшою методикою ЗНТ, яка дає змогу забезпечити порівняно вищий ступінь елімінації міоглобіну та інших середньомолекулярних чинників за допомогою поєднання конвекційного і дифузійного механізмів масопереносу. Іншими аспектами, що дають змогу підвищити ефективність видалення міоглобіну з внутрішнього середовища організму за рабдоміолізу, є висока точка відсікання мембрани гемофільтра і збільшення тривалості операції ЗНТ.

1.6. Біологічні властивості фулеренів

Молекула фулерену C_{60} , названа на честь архітектора Річарда Бакмінстера Фуллера, який споруджував будівлі у сферичній формі, нагадує футбольний м'яч, поверхня якого складається з 20 шестикутників і 12 п'ятикутників (рис. 3.1). Добре відомі й молекули C_{70} , C_{76} , C_{78} , C_{84} тощо. Однією з характерних рис

фулеренів є їхня здатність утворювати агрегати в розчинах [119]. У малополярних ароматичних розчинниках фулерени добре сольватовані та відносно непогано розчинні [120]. Молекулярна розчинність C_{60} у воді вкрай мала. За усередненими оцінками, ця величина перебуває в діапазоні від 2×10^{-24} до 1.1×10^{-11} М (тут і далі 1 М = 1 моль·л⁻¹) [121].

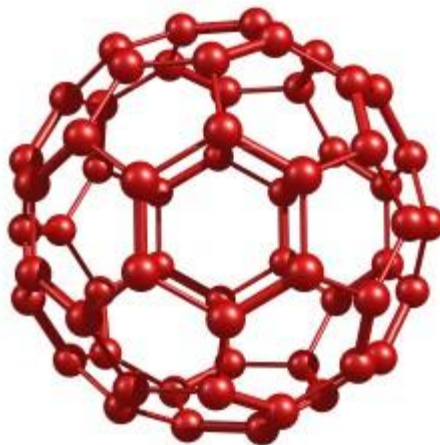


Рисунок 3.1. Структура молекули C_{60}

Водночас у воді фулерени порівняно легко утворюють гідрозолі та суспензії [122]. У високополярних органічних розчинниках молекулярна розчинність фулеренів надто низька, але в цьому випадку вони також схильні утворювати колоїдні розчини [123]. Фрактальні структури C_{60} спостерігалися, наприклад, у толуолі. Як уже зазначалося, деякі автори вважають, що в таких випадках агрегати виникають лише в результаті обробки ультразвуком [18]. Агрегати в таких розчинниках якщо взагалі й утворюються, то є нестійкими і руйнуються механічним струшуванням, а їхнє виникнення може бути частково зумовлене взаємодією з киснем

1.6.1. Вплив фулеренів C_{60} на біологічні системи.

Дослідження на моделі інтоксикації щурів тетрахлорметаном показали для фулерена вкрай виражену гепатопротекторну активність [124]. Як і у випадку із запальними ушкодженнями шкіри, захисний ефект фулерена на печінку пов'язують з антиоксидантною активністю. Тетрахлорметан, метаболізований

ферментами цитохрому р450, утворює радикал трихлорметил, що запускає ланцюг перекисного окислення ліпідів, результатом якого стає ушкодження клітинної мембрани та клітинна смерть [125]. Фулерен, однак, здатний ефективно зв'язувати трихлорметильний радикал, запобігаючи подальшому пошкодженню [126]. Крім спостережуваних візуально і мікроскопічно морфологічних ефектів, введення фулерену так само викликало зниження вироблення аскорбінової кислоти у відповідь на введення тетрахлорметану.

Одним зі значущих ефектів фулерена була здатність пригнічувати запалення в моделі ревматоїдного артрити *in vitro* на синовіальних фібробластах і макрофагах людини та *in vivo* на щурячій моделі колагеніндукованого аутоімунного артрити [127]. У дослідженні *in vitro* синовіальні фібробласти з макрофагами були відібрані у пацієнтів з ревматоїдним артритом і стимульовані фактором некрозу пухлини α , після чого у клітин визначали експресію прозапальних цитокінів. Як і в дослідженні спільного застосування фулерена та іринотекану, інкубація біоптату суглобів з фулереном C_{60} показала значне зниження експресії інтерлейкіну 1β . У дослідженні *in vivo* на щурах інтраартикулярне введення дисперсії фулерена показало значне поліпшення патоморфологічної картини, зниження синовіальної гіперплазії та зменшення інфільтрації прозапальними клітинами.

Схожі результати були раніше показані на моделі остеоартрити в кроликів [128]. У цьому дослідженні, однак, терапевтичний ефект пов'язують не з впливом на клітини імунної системи, а з посиленням катаболічної активності самих хондроцитів. Одним із ранніх досліджень, яке значною мірою окреслило інтерес наукового співтовариства до використання фулеренів у біології та медицині, було вивчення впливу перорального введення масляного розчину фулерену C_{60} на тривалість життя у щурів [129]. Це дослідження включало в себе визначення фармакокінетичних параметрів і вивчення впливу на системи окислювально-відновного гомеостазу. Як і в описаних вище дослідженнях автори відзначають незвичайну для такої великої молекули здатність фулерена проникати в мозок через гематоенцефалічний бар'єр і зниження стресу на глутатіонову систему

гомеостазу. Крім цього, дослідники заявляють про важливі нові дані, зокрема, здатність фулерена всмоктуватися в системний кровотік під час перорального введення. Однак цей висновок не можна поширювати на дисперсії в полярних середовищах, оскільки фізико-хімічні характеристики справжніх і колоїдних розчинів фулерена можуть значно відрізнятися.

Другим важливим спостереженням було значне (приблизно вдвічі) збільшення тривалості життя щурів, які отримували розчин фулерена, порівняно зі щурами з контрольної групи. Автори зазначають, що триваліший період введення розчину фулерену в теорії міг би призвести до більшого збільшення тривалості життя, проте введення препарату було припинено після смерті щурів з контрольної групи, оскільки початковий дизайн експерименту передбачав виключно оцінку токсичних властивостей препарату.

Варто також згадати нейропротективну дію фулерена. У мишачій моделі хвороби Альцгеймера, що створюється шляхом введення бетаамілоїду в гіпокампус миші, введення водної дисперсії фулерена давало змогу значно знизити вираженість ознак дегенерації нейронів [130]. Окислювальний стрес відіграє важливу роль у порушенні протеїнового синтезу в розвитку хвороби Альцгеймера [131], однак відновлення функції рибосом не цілком пояснює відсутність амілоїдних бляшок у місці введення, відзначену в дослідженні.

У літературі описано здатність фулерена перешкоджати агрегації бетаамілоїдів [132]. Серед похідних з нейропротективною дією слід відзначити карбоксифулерени. У дослідженні на культурі кортикальних нейронів карбоксифулерени значно знижували загибель клітин під впливом агоністів NMDA-рецепторів: N-метил-D-аспартату та α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолепропіонової кислоти [133]. Причому активність карбоксифулеренів у даному дослідженні значно перевищувала активність інших скавенджерів, використаних для придушення нейротоксичності досліджуваних агоністів.

1.6.2. Токсичність фулерена C_{60} та його похідних

Оскільки описаний у попередній частині потенціал використання фулеренів та його похідних у медицині є вкрай високим, оцінювання їхньої

токсичності видається важливим завданням для оцінювання реальних перспектив створення препаратів для медичного застосування на їхній основі. Слід підкреслити, що необхідно розрізняти токсичність, пов'язану безпосередньо з фулереновим ядром і токсичність, опосередковану модифікацією цієї молекули.

Функціоналізація C_{60} з метою підвищення його гідрофільності та зниження токсичності істотно впливає на характер його взаємодії з організмом [134]. Введення функціональних груп може нівелювати антиоксидантну активність фулерена, тобто різко змінити його характерні властивості. Хімічна модифікація фулерена має значний вплив на токсичність. Наприклад, величина LD_{50} фулеролу при внутрішньочеревному введенні мишам становила 1,2 г/кг [135]. В одній із перших робіт із фармакокінетики вивчали ефекти внутрішньовенного введення щурам препарату фулерена біс(2-аміноетил)-дифенілфунлфулерена, що має анти-BIL активність (інгібітор BIL-протеази). При введенні 15 мг/кг середній час персистенції препарату в плазмі становив ~7 годин, причому більш ніж на 99 % він був зв'язаний з білками плазми. За цієї дози речовина добре переносилася тваринами, але за 25 мг/кг у них спостерігалось прискорене дихання, різкі рухи та загибель через 5 хв. Токсичні ефекти не спостерігалися, коли той самий препарат вводили мишам внутрішньочеревно (в/б) у дозі 50 мг/кг протягом 6 днів]. Тим часом, вивчення токсичності водорозчинного поліалкілсульфонілфулерена показало, що він нетоксичний при пероральному введенні, а при в/б введенні його LD_{50} становило 600 мг/кг (виводиться речовина через нирки) [136].

Зазвичай при внутрішньовенному введенні похідні фулерена дуже швидко виводяться з кровотоку і накопичуються в печінці та інших органах, при цьому практично не вдається виявити їхні сліди в сечі та фекаліях. При пероральному введенні, навпаки, лише сліди виявляються в печінці через 6 год., тоді як близько 90 % екскретується, а в сечі виявляються лише сліди. Сукцинільне похідне фулерена, введене щурам внутрішньовенно, швидко розподілялося по всіх органах. При цьому воно утримувалося в тканинах близько тижня без серйозних

токсичних ефектів. При пероральному ж введенні спостерігалася його швидка елімінація з екскрементами. Випробування гідроксильованого фулерена, фуллерола, показали, що при його внутрішньочеревному введенні мишам і щурам LD₅₀ становило 0,5-2,4 г/кг [137]. При цьому показано (*in vivo*), що фуллероли можуть знижувати рівень мікосомальних ферментів і зменшувати активність P₄₅₀-залежної монооксигенази.

Біологічні ефекти водорозчинних форм фулерена залежать від різних чинників: методу отримання, одержуваної структури, ступеня агрегації його молекул у процесі зберігання, форми введення. Тому, не можна обговорювати токсичність фулерена як взагалі якоїсь речовини, необхідно враховувати вищевказані фактори, і прийняти, що його різні модифікації/форми є різними препаратами. Незважаючи на те, що фулерени використовуються вже 20 років, у жодній із країн світу їх не вивчали на безпеку в повному обсязі. Водночас є маса публікацій, пов'язаних з аналізом окремих проявів їхньої біологічної активності в експериментах *in vitro* та *in vivo*, з більшості яких випливає, що серйозних токсичних ефектів у фулерену C₆₀ виявлено не було. Перші роботи з дослідження токсичності фулерена з'явилися вже в 1995-96 рр. [138], і в них було показано, що при введенні мишам фулерена в дозі 2,5 г/кг, він не спричиняв загибелі мишей і побічних ефектів у тварин при спостереженні протягом 8 тижнів. Зазначалося, що при внесенні фулерена в середовище з культурою людських кератиноцитів або фібробластів спостерігається його досить швидке поглинання за відсутності впливу на проліферацію [139].

Багато подальших досліджень показали, що C₆₀ не має гострої токсичності, а токсичні ефекти, які іноді спостерігаються, пов'язані з токсичними органічними розчинниками, що використовуються для приготування розчинів C₆₀. Введення внутрішньочеревно мишам суспензії фулерена в дозі 100 мг/кг не впливало на їхні поведінкові реакції (тест Irwin) порівняно з контролем. Також, під час вивчення гострої пероральної токсичності на щурах для суміші фулеренів C₆₀ і C₇₀ (фулерет) у дозі 2000 мг/кг за весь період спостереження не спостерігалось жодних негативних ефектів [140].

Вплив фулерену на шкіру вивчали на мишах, вводячи зразок внутрішньошкірно в дозі 200 мкг. Через 72 години не було виявлено жодного впливу ні на синтез ДНК, ні на індукцію орнітиндекарбоксилази в епідермісі. Після підшкірного введення зразка фулерена в дозі 100 мг/кг протягом 24 тижнів розвиток пухлин (на відміну від групи мишей, яким вводили тетрадеканоїлфорболацетат) не спостерігався [141].

Загалом, незважаючи на велику кількість біомедичних досліджень фулерена, існує ще невизначеність щодо оцінки його гострої та, особливо, хронічної токсичності, що значною мірою зумовлено розмаїттям методик, які застосовуються різними групами дослідників. Однак дедалі більше даних свідчать про нешкідливість немодифікованої форми фулерена. Тривалий експеримент (5,5 років) був проведений на щурах, у дієту яких додавали фулерен у вигляді розчину в оливковій олії (C_{60} -Olive), як контроль використовували дієти з додаванням просто оливкової олії та води. Виявилося, що фулерен майже вдвічі збільшував тривалість життя щурів, а динаміка зміни ваги тварин говорила про відсутність явних токсичних ефектів. Аналіз механізмів дії з використанням експериментальної моделі інтоксикації щурів чотирихлористим вуглецем, показав, що вплив фулерену на тривалість життя пов'язаний, мабуть, із пригніченням окисного стресу.

Експерименти, проведені на щурах, показали, що водна дисперсія C_{60} , стабілізована крохмалем, не проявляє хронічної токсичності при інтрагастральному введенні щурам, не виявлено значущих відмінностей у гематологічних і біохімічних показниках порівняно з контролем [142]. Загалом, для немодифікованого фулерена не відмічається токсичних ефектів для ссавців, що робить його привабливим кандидатом для розробки лікарських засобів. Від його похідних його вигідно вирізняє відсутність відмінностей у токсичних проявах, що можуть бути пов'язані зі способом отримання: токсичність похідних фулерена з однаковими замісниками може відрізнятися в кілька разів залежно від їхнього просторового розташування [143].

1.6.3. Отримання водорозчинних форм фулерену

Фулерени без додаткової обробки практично нерозчинні у воді [144, 145]. Дослідженнями показано можливість хімічної модифікації фулеренів з отриманням водорозчинних продуктів, однак цей підхід має низку недоліків, детально описаних вище: токсичність подібних похідних зазвичай виявляється вищою, а біологічна активність, пов'язана з хімічною активністю sp^3 -гібридизованих атомів вуглецю, знижується. Однак, фулерени здатні утворювати у воді вкрай стійкі колоїдні розчини (раніше згадувані як водні дисперсії або нанодисперсії фулерена) з розміром часток, що вимірюється десятками або сотнями нанометрів [146]. Цей підхід активно використовували для отримання водних дисперсій для біологічних випробувань.

1.6.4. Антиоксидантні ефекти фулеренів.

Властивість фулеренів і їхніх похідних нейтралізувати кисневі вільні радикали була вперше описана у 1991 році. У журналі "Science" дослідницька група під керівництвом Krustic охарактеризувала молекулу фулерену C_{60} як «губку для вільних радикалів». Було встановлено, що одна молекула C_{60} може приєднати до 34 метильних радикалів. Антиоксидантна активність фулеренів визначається кількістю реактивних центрів на молекулі, а також просторовим розташуванням цих центрів відносно цільових атомів. Фулерени демонструють високу здатність до зв'язування та знешкодження як супероксид-аніон-радикалів, так і гідроксильних радикалів, як у лабораторних умовах (*in vitro*), так і в живому організмі (*in vivo*).

Фулерен C_{60} добре розчиняється в органічних розчинниках, але практично нерозчинний у воді. Ця властивість різко ускладнює вивчення фізіологічних і фармакологічних ефектів фулеренів. У зв'язку з цим нині синтезовано цілу низку похідних фулерену C_{60} , що мають задовільну розчинність у полярних розчинниках. Здійснювалися спроби дослідити антиоксидантну активність фулерену C_{60} при додаванні останнього в перфузійний розчин для перфузії ізольованого серця щура. Chueh і співавт. відтворювали 15-хвилинну глобальну

ішемію ізольованого серця та 30-хвилинну реперфузію. Вміст вільних радикалів у перфузаті, що відтікає від серця, у період реперфузії оцінювали за допомогою електронно-парамагнітно-резонансної (ЕПР) спектроскопії. При додаванні в перфузат фулерену C_{60} інтенсивність ЕПР-сигналу, що корелює з вмістом вільних радикалів, була значно нижчою, ніж за його відсутності.

Антиоксидантна активність фулерену C_{60} була продемонстрована при трансплантації тонкої кишки в експериментах на собаках. Відомо, що реперфузія ішемізованого трансплантата спричиняє масоване утворення вільних радикалів, які відіграють ключову роль у пошкодженні трансплантата. Експериментальні дані свідчать про те, [147] що модифіковані C_{60} фулерени виявляють захисну активність проти окисного стресу, індукованого апоптозом у моновуклеарних клітинах периферичної крові людини. За попередньої обробки мишей метамфетаміном та морфієм вони сприяли ефективному зниженню летальності клітин головного мозку, яка є наслідком окисного стресу. Досліджено ефективність впливу C_{60} фулерену на кількість вільних радикалів і процеси руйнування на моделі ад'ювантного артриту у щурів.¹⁶⁶ Захисний ефект C_{60} фулерену проявлявся у збільшенні активності антиоксидантних ферментів, SOD в печінці і нирках, каталази у нирках порівняно з контрольною групою. Також зазначено, що його захисна дія спрямована на пригнічення деструктивних процесів у сполучній тканині. Встановлено, що деякі похідні C_{60} фулерену, діючи як каталізатори, здатні імітувати дію SOD – ферменту, який бере участь у нейтралізації супероксид-аніон радикала.

Показано, що введення водних розчинів гідратованих C_{60} фулеренів - $C_{60}HyFn$ (з концентрацією 30 нМ, що еквівалентно 21,6 мг/мл, у питній воді) за хронічної алкоголізації щурів захищає тканини центральної нервової системи від пошкоджень, викликаних окислювальним стресом, запобігає патологічній втраті астроцитів і гліальних фібрилярних кислих білків (GFAP, маркерів астроцитів) і, як наслідок, через їх адаптогенні ефекти, $C_{60}HyFn$ значно покращує поведінкову реакцію та усуває емоційні дефіцити, викликані хронічним вживанням алкоголю [148]. Ця властивість є важливою для боротьби з м'язовою дегенерацією,

характерною за тривалої алкоголізації, особливо за необхідності швидкого максимально можливого відновлення функціонування ушкодженого м'яза після припинення надходження етилового спирту.¹⁷⁸

У низці досліджень було встановлено, що застосування водорозчинних фулеренів C60 чинить виражений позитивний терапевтичний вплив при різних патологічних станах, таких як ішемічне ушкодження [149], фізичне виснаження [150], м'язова атрофія [151], травматичні ураження скелетної мускулатури [152] та інтоксикація пестицидами [153].

Позитивний ефект значною мірою залежав від дозування і схеми введення фулеренів у водному розчині на фоні конкретного патологічного процесу.

Отже, враховуючи вже наявні дані щодо антиоксидантного потенціалу C60-фулеренів, доцільним є подальше вивчення їхнього впливу на механізми вільнорадикального окислення у пошкодженій скелетній м'язовій тканині.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Лабораторні щури як модель для дослідження гострого ниркового ушкодження, спричиненого рабдоміолізом.

Для проведення експериментального моделювання гострого ниркового ураження (ГНН), індукованого рабдоміолізом, було використано 90 клінічно здорових самців щурів інбредної лінії Wistar віком від 25 діб. Тварини утримувались у віварії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Дослідження проводилось згідно з протоколом, затвердженим комісією з біоетики Волинського національного університету імені Лесі Українки (Протокол № 2 від 15.12.2021 р.), відповідно до вимог Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для наукових і експериментальних цілей (Страсбург, 1986) [154], а також положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3446-IV від 21.02.2006 р. [155].

Умови утримання щурів відповідали санітарно-гігієнічним нормам: оптимальний температурний режим, освітлення, постійний доступ до чистої питної води, яку замінювали щодня. Годування здійснювалось щоденно з урахуванням фізіологічних потреб (30–35 г корму на добу), з балансуванням раціону за енергетичною цінністю, вмістом білків, жирів, вуглеводів, вітамінів і мінералів. Додатково до раціону вводився вітамінний комплекс “Trixie Vitamin Granulat” (Німеччина).

На період експерименту тварин розміщували в індивідуальних клітках. Усі біологічні відходи, включаючи тіла тварин, використані медичні препарати та матеріали, утилізували відповідно до чинного законодавства України, а саме Закону України «Про відходи» [156], що регламентує поводження з відходами у сфері медичних, ветеринарних і науково-дослідних робіт.

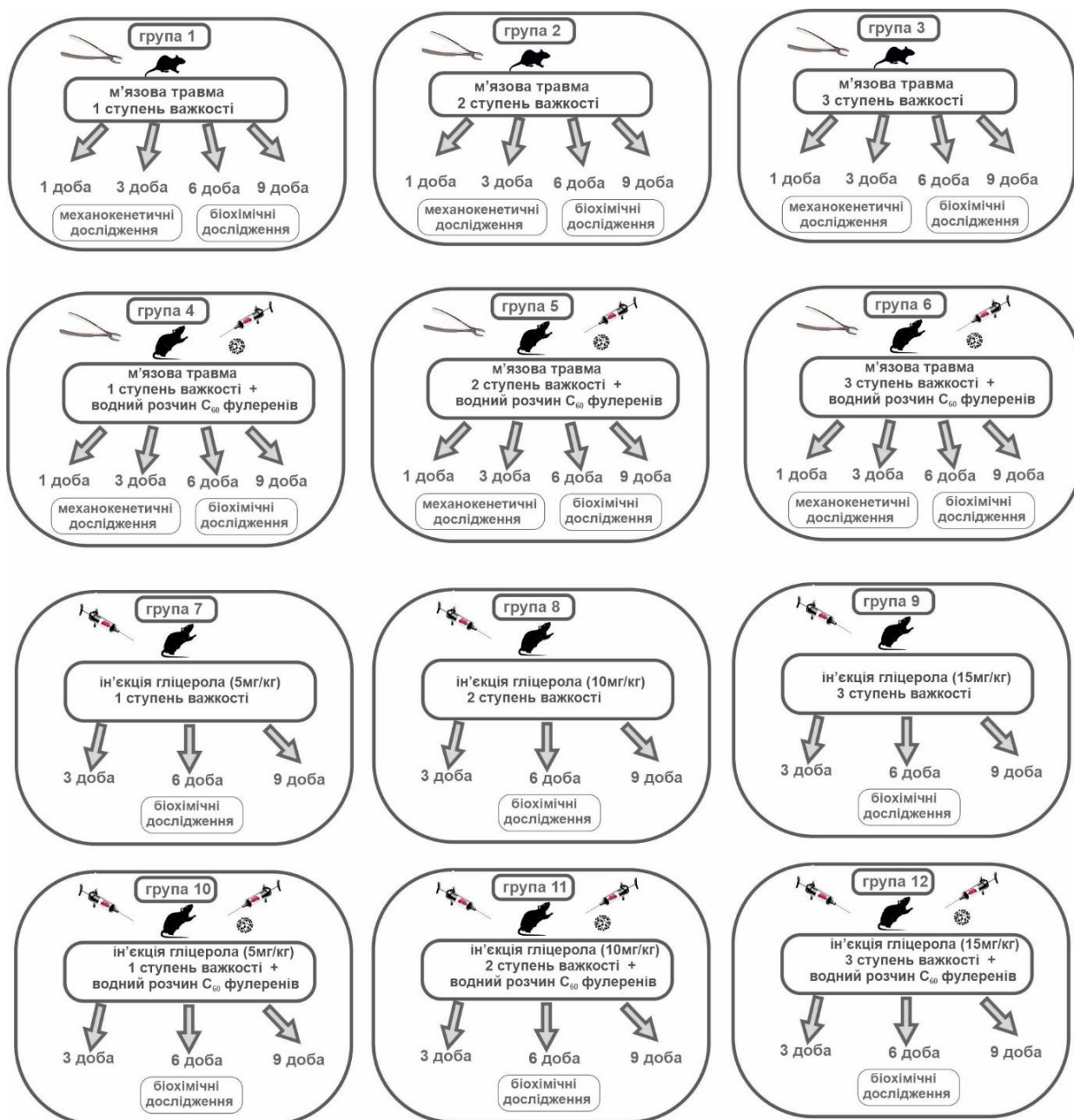


Рис.2.1 Схема експерименту.

Тварини, відібрані для експерименту, були розділені на 15 експериментальних груп ($n = 5$):

- контрольні 3 групи,
- модельної патології механічної руйнації піддослідного м'язу 1,2 та 3 рівня важкості (на 1,3,6 та 9 добу після м'язової травми);
- модельної патології з внутрішньочерівним введенням розчину C_{60} фулерену в концентрації 1 мг/кг одразу після ініціації м'язового пошкодження.

- модельної патології гліцеролової травми (на 3, 6 та 9 добу після введення розчину гліцерину у 3-х дозах: 5, 10 і 15 мг/кг ваги тварини

- модельної патології гліцеролової травми за умов введення водного розчину C₆₀ фулерену.

М'язову травму у першій серії експериментів викликали, стискаючи м'яз упродовж 1 хв зажимом під тиском 2,5 3,5 та 4,5 кг на см³ [157]. Застосований crush syndrome приводив до системного прояву патологічних змін та руйнування м'язових клітин, зокрема вивільнення компонентів м'язової клітини (креатинкіназа, міоглобін) у позаклітинне середовище, що слугувало маркером рівня м'язової травми різних ступенів важкості.

У другій серії експериментів рабдоміоліз з наступним ураженням нирок моделювали введенням 50% розчину гліцерину внутрішньом'язово в musculus soleus трьома ін'єкціями. Розчин фулерену вводили внутрішньочеревно в дозі 1 та 2 мг/кг через 48 годин після гліцеринових ін'єкцій щодня протягом всього експерименту.

2.2. Хірургічні маніпуляції.

Усі хірургічні втручання та забій тварин здійснювалися відповідно до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для наукових та експериментальних цілей (Страсбург, 1985), а також згідно з положеннями біомедичної етики відповідно до чинного законодавства України, зокрема Закону № 3446-IV від 21.02.2006 року «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Перед проведенням операцій усі хірургічні та мікрохірургічні інструменти проходили стерилізацію шляхом занурення у 0,8–1,6% розчин сайдезиму на 15 хвилин. Після стерилізації інструменти зберігали у спеціальних герметичних стерильних контейнерах. Операції проводили з дотриманням асептичних умов.

Загальна анестезія у щурів досягалася за допомогою тіопенталу натрію (“ARTE-RIUM”, Україна) у дозі 50 мг/кг. Попередньо проводилась премедикація

0,1% розчином атропіну (“ДЗ ГНЦЛС”, Україна) у дозі 0,1 мл за 30 хвилин до введення наркозу з метою запобігання розвитку паралітичної асфіксії. Глибину анестезії контролювали шляхом перевірки згинального рефлексу задньої кінцівки при натисканні на великий палець стопи.

Перед початком операції щура зважували на електронних вагах AXIS AD-50 (Польща), після чого фіксували на операційному столі у положенні на спині, використовуючи спеціальну подушку для стабілізації тіла. Передні та задні кінцівки тварини закріплювали еластичними стрічками, приєднаними до ротаційних важелів операційного столу.

Для візуалізації м'яза в ділянці гомілковостопного суглоба (*articulatio talocruralis*) виконували циркулярний розріз шкіри. Шкіру акуратно відтягували проксимально пінцетом. Для доступу до *m. soleus* здійснювали розріз навколом'язової фасції за допомогою ножиць, уникаючи пошкодження судинно-нервового пучка, розріз проводили з його латерального боку. Після цього видаляли поверхневі м'язи — *m. biceps femoris* та *m. semitendinosus*. Глибокі м'язи (згиначі, малогомілкові та м'язи передньої частини гомілки) залишалися інтактними (рис. 2.2).

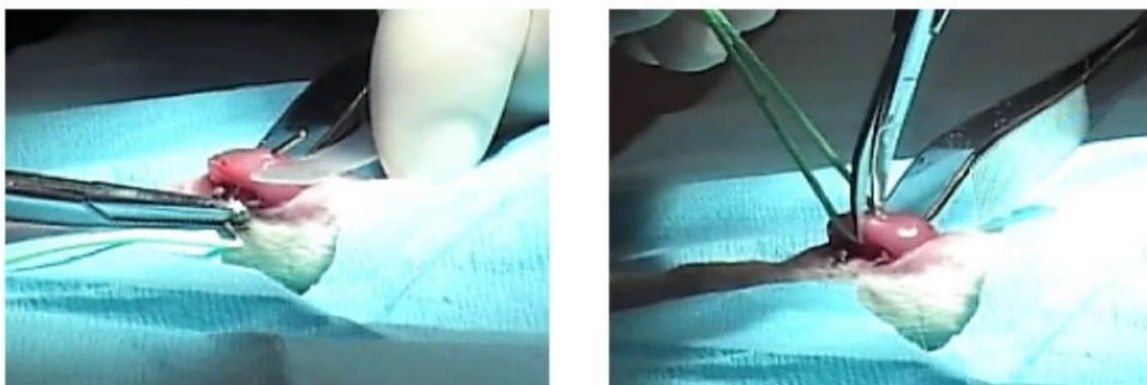


Рис.2.2 Хірургічне відокремлення досліджуваного м'язу.

Далі, за допомогою хірургічних ножиць, здійснювали відсікання проксимального сухожильного краю *musculus soleus* від *epicondylus medialis* стегнової кістки (*os femoris*) та від ділянки латеральної сесамоподібної суглобової поверхні (*facies articularis sesamoidea lateralis*). Після цього проводили

перерізання гілки великогомілкового нерва (n. tibialis), яка відповідає за іннервацію m. soleus, при цьому інші гілки цього нерва залишали неушкодженими. Завершальним етапом була екстирпація (видалення) m. soleus (рис. 2.3). Протягом усього процесу препарування м'язові тканини гомілки періодично зволожували стерильним 0,9 % фізіологічним розчином натрію хлориду (NaCl), підігрітим до температури тіла (приблизно 37 °C), з метою запобігання висиханню біоматеріалу. Після завершення хірургічного втручання рану ушивали та обробляли антисептиком — 5% спиртовим розчином йоду для профілактики інфекційних ускладнень.

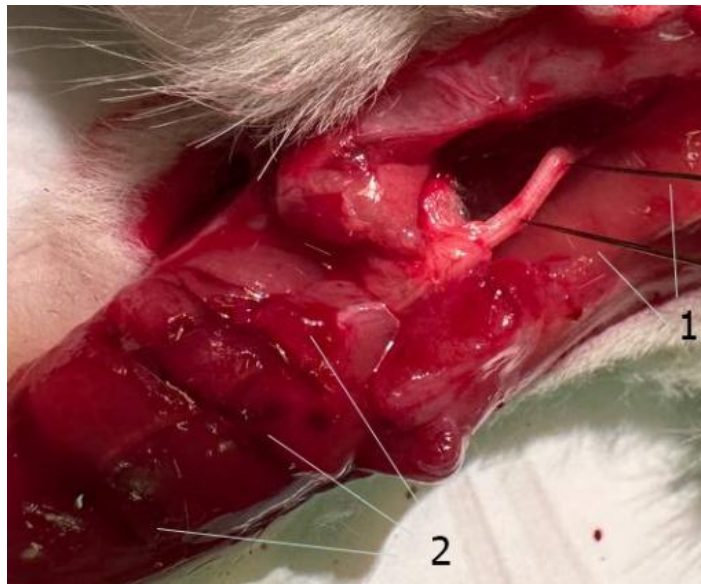


Рисунок 2.3. Препарування м'яза для вільно доступу до нерва (пояснення в тексті).

1- нерв підготовлений для стимуляції, 2 – результати механічного пошкодження м'язу.

Після завершення експериментальних процедур тварини були гуманно евтаназовані шляхом внутрішньовенного введення надлєтальної дози тіопенталу натрію (0,7 мг на 100 г маси тіла).

Для очищення м'яза від залишків фасціальної сполучної тканини використовували стерильні хірургічні інструменти — пінцети та ножиці. Ці

маніпуляції виконували під візуальним контролем за допомогою стереомікроскопа Brunel IMX Zoom Trinocular, що забезпечувало точність виділення м'яза. Проксимальний сухожильний кінець м'яза фіксували за допомогою механічного затискача, прикріпленого до лінійного серводвигуна. Дистальний кінець прикріплювали до системи навантаження серводвигуна, оснащеної інтегрованим датчиком сили (рис. 2.3). Після фіксації визначали початкову рівноважну довжину м'яза (L_0), за якої м'язове напруження не спостерігалось. Цей параметр був необхідний для подальшого вимірювання силової відповіді м'яза в умовах ізолюваного експерименту.

2.3. Анатомо-гістологічна характеристика *musculus soleus*

Для проведення дослідження було обрано *musculus soleus* — повільноскорочувальний м'яз, що характеризується переважно аеробним типом метаболізму. Цей м'яз є більш чутливим до розвитку рабдоміолізу порівняно з швидкими м'язами, такими як *musculus gastrocnemius*. Відмінності в чутливості пояснюються різним метаболічним профілем м'язових волокон.

Зокрема, *musculus gastrocnemius* містить переважно волокна типу II — швидкі, анаеробні, які отримують енергію переважно шляхом гліколізу. Натомість у складі *musculus soleus* приблизно 91% становлять повільні волокна типу I, які функціонують за рахунок окислення тригліцеридів і меншою мірою — глікогену. Оскільки ці волокна залежать від окисного фосфорилування, вони виявляють вищу чутливість до дефіциту кисню, що виникає при міолітичному ураженні тканин.

Musculus soleus, або камбалоподібний м'яз, є товстим, плоским, двоперистим м'язом із коротким черевцем, що відповідає його назві. Він розташований під *musculus gastrocnemius* і починається тонким сухожиллям від головки маломілкової кістки. М'яз спрямований донизу, поступово переходячи у плоске сухожилля, яке зливається з сухожиллям литкового м'яза. Разом вони формують потужне п'яткове (ахіллове) сухожилля — *tendo calcaneus*, яке прикріплюється до п'яткової кістки.

2.4. Обладнання для реєстрації скорочення

Для вимірювання сили скорочення пучків скелетних м'язових волокон використовувалась тензометрична установка, розроблена на кафедрі біофізики Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Система являла собою комплекс обладнання, що включав експериментальну камеру з вбудованими сенсорами, у якій розміщувався зразок м'язової тканини, а також насосну систему з дозаторами, сенсори сили та довжини, генератор синхронізованих імпульсів, систему температурного контролю, осцилографи, комплекс аналого-цифрового та цифро-аналогового перетворення (АЦП-ЦАП), персональний комп'ютер та оптичні пристрої для візуального спостереження і маніпуляцій із препаратом (рис. 2.4).

Стимуляція м'язових волокон здійснювалася електричними імпульсами прямокутної форми тривалістю 2 мс. Ці імпульси формувалися генератором імпульсів Aurora Scientific, керованим через ЦАП. Сигнал подавали на платинові електроди, які нерухомо встановлювались у камері експерименту паралельно один одному на відстані 8 мм (рис. 2.5).

Тривалість одного циклу стимуляції становила 3000 мс. Параметри електричного сигналу задавались програмним забезпеченням і передавались з системи АЦП-ЦАП до генератора з максимальною затримкою не більше 0,007 мс, що забезпечувало високу точність та відтворюваність стимуляції м'язових зразків.

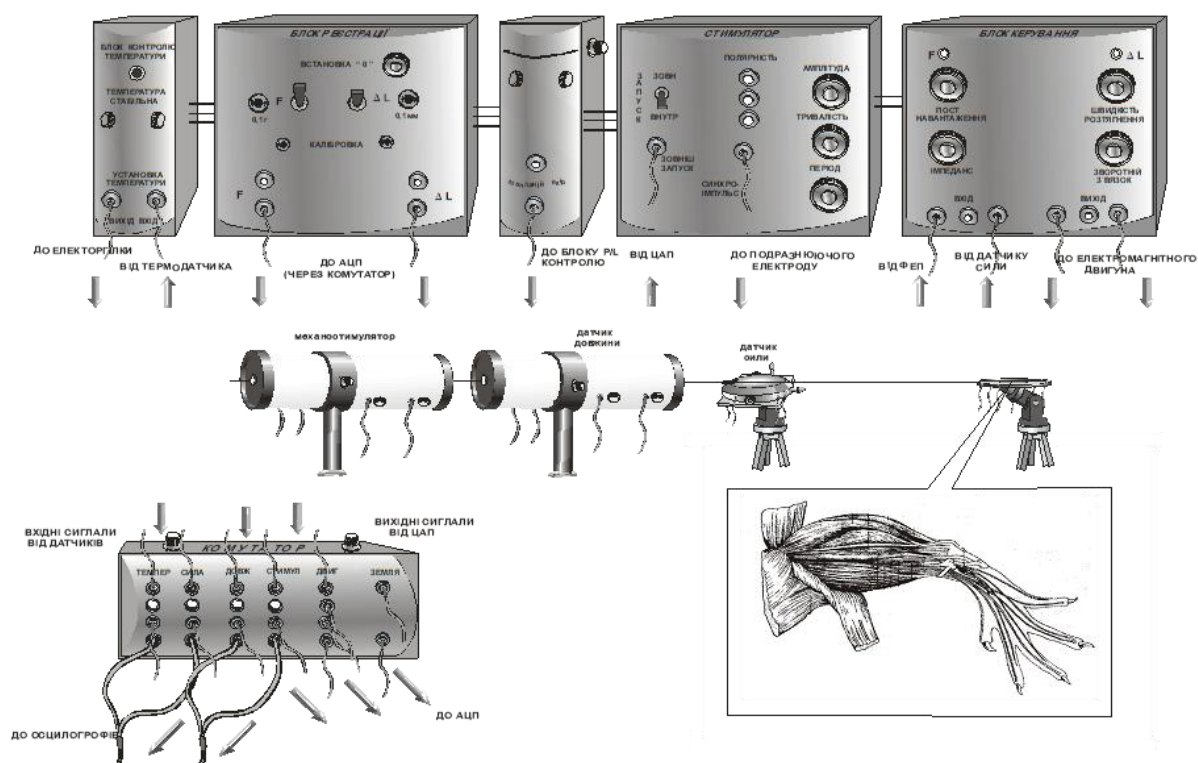


Рисунок 2.4. Загальний схема тензометричної установки (пояснення в тексті).

Аналогові електричні імпульси, згенеровані системою стимуляції, передавались до м'язового зразка через стимулюючі електроди, які були розташовані у дослідницькій камері. Час затримки сигналу при передачі не перевищував 0,08 мс. Загальний часовий зсув фіксувався на вході системи АЦП-ЦАП, що дозволяло врахувати і компенсувати його під час подальшої обробки отриманих даних. Криві м'язової відповіді, представлені у роботі, будувались із урахуванням цієї затримки сигналу на вході та виході перетворювача.

Полярність стимулюючого сигналу могла регулюватися відповідно до симетрії розташування електродів щодо м'язового зразка в камері, що забезпечувало оптимальні умови для стимуляції. Паралельно здійснювався візуальний контроль характеристик імпульсу за допомогою катодного осцилографа.

Реєстрацію зміни сили скорочення м'яза виконували за допомогою п'єзоелектричного сенсора, підключеного до системи підсилювачів сигналу. Датчик сили було закріплено на тривісному мікропозиційному столику з

мікрометричними регулюваннями, що забезпечувало точне позиціювання відносно камери та сенсора довжини волокна.

Чутливість використовуваного у досліді тензодатчика становила 1 г/10 В, що повністю відповідало вимогам точності та чутливості для виконання даного типу експерименту (рис. 2.6).



Рисунок 2.5. Двофазний стимулятор електричних імпульсів. (пояснення в тексті).



Рисунок 2.6. Датчик сили Harvard 50-500 тензометричної сервокерованої установки (пояснення в тексті).

Зовнішнє навантаження на м'язовий зразок здійснювали за допомогою механостимуляційної системи (рис. 2.7). Механічне збурення реалізовувалось через лінійний електромагнітний двигун, що забезпечував точне переміщення з кроком 1 В/мм. Власна податливість даного пристрою становила приблизно 5 мкН/мм, що відповідало високій чутливості необхідній для точного дозування зусиль.

Механостимулятор був мобільно закріплений на базовій частині експериментальної установки з використанням мікроманіпуляторної системи, що дозволяло точно позиціонувати його навпроти датчика довжини. Така конфігурація забезпечувала паралельне вирівнювання обох пристроїв відносно камери, у якій містився досліджуванний м'язовий препарат.

Система включала замкнений контур зворотного зв'язку між датчиком сили та механостимулятором. Це дозволяло реалізувати точний та дискретний контроль як сили, так і довжини в будь-який момент м'язового скорочення. Власна податливість сервосистеми установки становила близько 0,01 градуса на ньютон, що забезпечувало стабільність роботи системи навіть при мінімальних навантаженнях.



Рисунок 2.7. Система механоконтролю Aurora Scientific тензометричної сервокерованої установки (пояснення в тексті).

Датчики сили та довжини були підключені до підсилювальних модулів та комплексу аналого-цифрового і цифро-аналогового перетворення (АЦП–ЦАП). Аналогові сигнали, отримані з сенсорів, передавалися на аналого-цифровий перетворювач, де вони оцифровувалися з частотою дискретизації 1 кГц і роздільною здатністю 12 біт (рис. 2.8).

Процес електронного перетворення супроводжувався фазовим зсувом вихідного сигналу відносно початкових, необроблених кривих. Середній час затримки, який виникав у перетворених осциляціях сигналу, становив приблизно 10 мс. Цей параметр обов’язково враховували під час аналізу отриманих кривих скорочення м’яза.

Командні сигнали, які формувались на виході цифро-аналогового перетворювача, проходили попереднє масштабування за допомогою підсилювачів та подальшу низькочастотну фільтрацію. Смуга пропускання фільтра становила 0–100 Гц, що дозволяло ефективно усунути високочастотні перешкоди та зберегти основні характеристики фізіологічних сигналів.



Рисунок 2.8. АЦП-ЦАП тензометричної сервокерованої установки (пояснення в тексті).

Під час дослідження постійно фіксували тиск та частоту серцевого ритму за допомогою ветеринарного монітору пацієнта (рис.2.9) За необхідності вводили суміш фізіологічного розчину, реополіглюкіну і глюкози, а анестезію продовжували введенням внутрішньочеревно суміші кетамін/ксілазін ($\frac{1}{4}$ початкової дози) кожні 30-40 хв до закінчення експерименту.

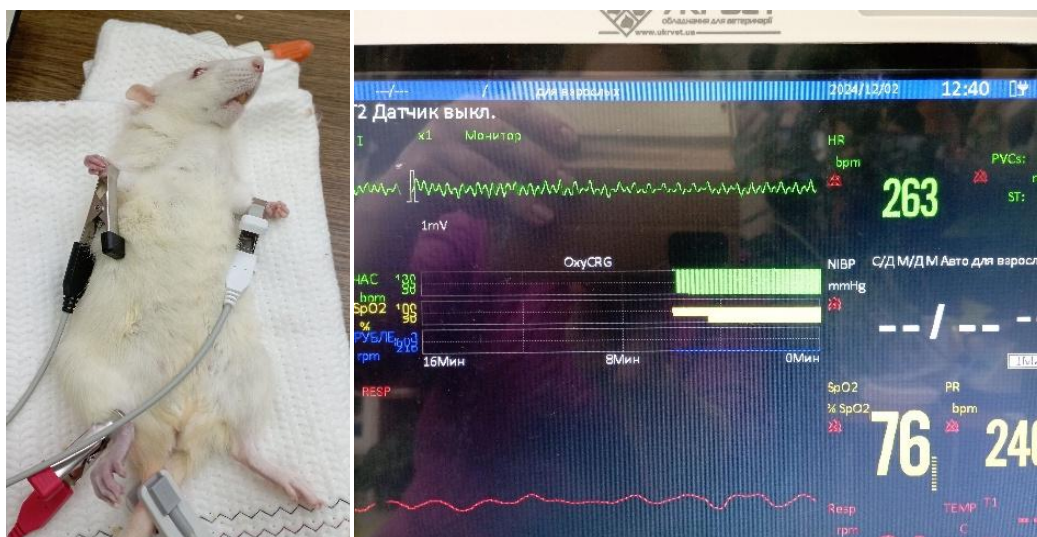


Рис.2.9. Фіксація фізіологічних параметрів тварини під час дослідження. (пояснення в тексті).

Дослідницький комплекс, включаючи експериментальну камеру, а також сенсори сили та довжини, був встановлений у заземленому металевому боксі. Таке екрановане середовище дозволяло ефективно мінімізувати вплив зовнішніх електромагнітних завад і механічних вібрацій під час проведення експериментальних вимірювань.

2.5. Визначення біохімічних параметрів ГНН індукованою рабдоміолізом

Рівень вмісту ЛПНЩ, креатиніну, сечовини, концентрації натрію, активність каталази та супероксиддисмутази у крові піддослідних тварин, як маркерів ниркового пошкодження та показників про-та антиоксидантного балансу, визначали за допомогою клініко-діагностичного обладнання — гемоаналізаторів RNL-200 та JN-1101-TR2 (Нідерланди) та автоматичного

біохімічного ветеринарного аналізатору гемостатики та біохімії крові Seamaty SMT-120VP (рис.2.10)



Рис.2.10. Автоматичний аналізатор гемостатики та біохімії крові Seamaty SMT-120VP (пояснення в тексті).

Швидкість клубочкової фільтрації визначали за кліренсом ендogenous креатиніну:

$$GFR = (V \times U_{Cr}) : pCr,$$

де GFR – швидкість клубочкової фільтрації, V – об'єм сечі, U_{Cr} – концентрація креатиніну в сечі, pCr – концентрація креатиніну в плазмі крові.

Для комплексної оцінки натрієвого транспорту в нефронах використовували показник фракційної екскреції натрію (FENa), який характеризує співвідношення між профільтрованим та виведеним із сечею натрієм. Розрахунок здійснювали за загальноприйнятою формулою:

$$FE_{Na}: FE_{Na}(\%) = 100\% \times (Cr_S \times Na_U) / (Na_S \times Cr_U),$$

де Cr_S та Cr_U – концентрації креатиніну у плазмі крові та сечі, відповідно, Na_U та Na_S – концентрації натрію у сечі та плазмі крові, відповідно.

2.6. Вимірювані параметри скорочення *musculus soleus*

Стимуляцію камбалоподібного м'яза (*musculus soleus*) здійснювали за допомогою електричних імпульсів прямокутної форми зі стандартними параметрами. Частота стимуляції становила 30–50 Гц, тривалість окремого імпульсу — 0,2 мс. Тривалість одного стимуляційного сеансу (пробігу) варіювалася від 3000 до 5000 мс. Інтервал релаксації між окремими пробігами становив 3 хвилини, що забезпечувало повне відновлення функціонального стану м'яза між навантаженнями. Загальна кількість стимуляційних пробігів у межах одного експериментального тесту становила 10.

Аналізували декілька механокінетичних параметрів тетанічного скорочення м'яза.

Максимальну силу скорочення (F_{max} (%)) розраховували як відношення максимальної амплітуди кожного тетанусу до амплітуди тетанусу контрольної групи, яку приймали за 100 %. Даний параметр є показником загальної дисфункції м'язової системи, тобто зниження максимально можливої силової відповіді за розвитку паталогій (ішемічне ушкодження на фоні алкогольної міопатії). Зміна його може бути пов'язано порушенням в нейронному компоненті. Проте, в умовах наших експериментів тетанічні скорочення викликали електричною стимуляцією, що не залежить від ЦНС, тому дисфункція обумовлена міотичними складовими. Зокрема вона може бути результатом зміни деполяризації мембранних систем міоцитів і порушенням внутрішньоклітинної провідності. Це, в свою чергу, перешкоджає розвитку збудження, а саме зумовлює паталогічне перетворення послідовності потенціалів дії, які запускають м'язове скорочення, що і викликає максимальну силу. Враховуючи механізми розвитку ішемічного ушкодження на фоні алкогольної міопатії зниження максимальної сили скорочення пов'язане з виснаженням внутрішньоклітинних запасів АТФ; зміною рівня внутрішньоклітинної

концентрації іонів кальцію в міоплазмі; зменшенням кількості скоротливих білків, а отже і кількості поперечних містків, які утворюються під час скорочення, або зменшенням сили їхнього зв'язку.

Один із ключових маркерів у цьому дослідженні, що використовувався для характеристики загальної працездатності м'яза при заданому режимі стимуляції була інтегрована потужність. Аналіз цього показника дозволяв оцінити взаємодію між генерованою м'язовою силою та прикладеним зовнішнім навантаженням, що, в свою чергу, відображає функціональний потенціал м'язової системи в умовах експерименту — тобто кількість механічної роботи, яку здатен виконати м'яз за одиницю часу.

Час досягнення пікової тетанічної сили (Δt_1 , мс) визначали як часовий інтервал між початком скорочення м'яза і досягненням його максимального тетанічного напруження ($F_{\max}$, %). Зміни цього параметра є індикатором ступеня функціонального порушення скоротливої здатності м'яза під час реалізації максимальної силової відповіді.

Аналіз **втомлюваності м'язового препарату** здійснювався за умов безрелаксацийної стимуляції, що дозволяло виявляти прояви втоми в різних часових діапазонах. Для цього проводили вимірювання часових інтервалів, необхідних для зниження сили м'язового скорочення до 75% та 50% від початкового рівня при послідовному стимулюванні.

У контрольних тварин ці параметри мали значну варіабельність та розтягнуті часові межі, що ускладнювало точну кількісну оцінку втомлюваності. У зв'язку з цим, для підвищення точності аналізу зміни силової відповіді в контрольній групі приймали за 100%, а всі інші варіанти виражали у відсотковому співвідношенні до цього значення.

Зазначені показники мають важливе значення для аналізу переходу активного м'яза з фази зубчастого тетанусу до стану повного тетанічного скорочення, що відображає ступінь інтегративного функціонального стану м'язової системи.

2.7. Гістологічний аналіз.

Зразки нирок і м'язів відокремлювали і фіксували в 10% формаліні, заливали в парафін, нарізали на зрізи 5 мкм і фарбували гематоксиліном і еозином (H&E) для загального гістопатологічного аналізу. Зрізи м'яза додатково фарбували гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гісоном для виявлення сполучної тканини та м'язових волокон. Цифрові мікрофотографії пофарбованих зрізів були зроблені при збільшенні $\times 100$ і $\times 400$ за допомогою комп'ютерної системи аналізу зображень (що складається з мікроскопа Olympus BX41 і цифрової камери Olympus C-5050 Zoom). Гістопатологічні профілі м'язів і нирок визначали за допомогою світлової мікроскопії. Потім за допомогою програмного забезпечення ImageJ вимірювали діаметри м'язових волокон і площу, зайняту сполучною тканиною в м'язових пучках. Крім того, вимірювали площу поперечного перерізу ниркових клубочків і діаметр ниркових трубок у нирках за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

2.8. Отримання водного розчину фулеренів C_{60} .

Для приготування водного колоїдного розчину фулерену C_{60} було використано метод переносу молекул з органічного розчинника (толуолу) у водне середовище з подальшою ультразвуковою обробкою. На першому етапі змішували рівні об'єми дистильованої води та насиченого розчину високочистого C_{60} (чистота $>99,5\%$) у толуолі, де концентрація фулерену досягала граничної розчинності — близько 2,9 мг/мл. Суміш поміщали у відкритий посуд (скляний стакан) і піддавали дії ультразвуку.

Обробку проводили до повного випаровування толуолу. Завершення процесу візуально ідентифікували за появою характерного жовтого відтінку у водній фазі (рис. 2.11), що свідчило про наявність фулерену у колоїдному стані.

Молекули C_{60} у водному середовищі переважно розміщувалися або хаотично на поверхні, або формували просторові кластери з кількох десятків частинок. Така структура зумовлена електростатичним відштовхуванням між молекулами, що підтверджується вимірюванням дзета-потенціалу — його

значення становило -25,3 мВ при температурі навколишнього середовища, що вказує на добру стабільність колоїду.

Ультрафіолетовий спектр одержаного розчину демонстрував дві виражені широкі смуги поглинання зі спектральними максимумами на довжинах хвиль 265 та 345 нм. За умов зберігання при температурі +4 °С отриманий водний колоїдний розчин фулерену C_{60} залишався стабільним упродовж 12 місяців при концентрації до 0,15 мг/мл.

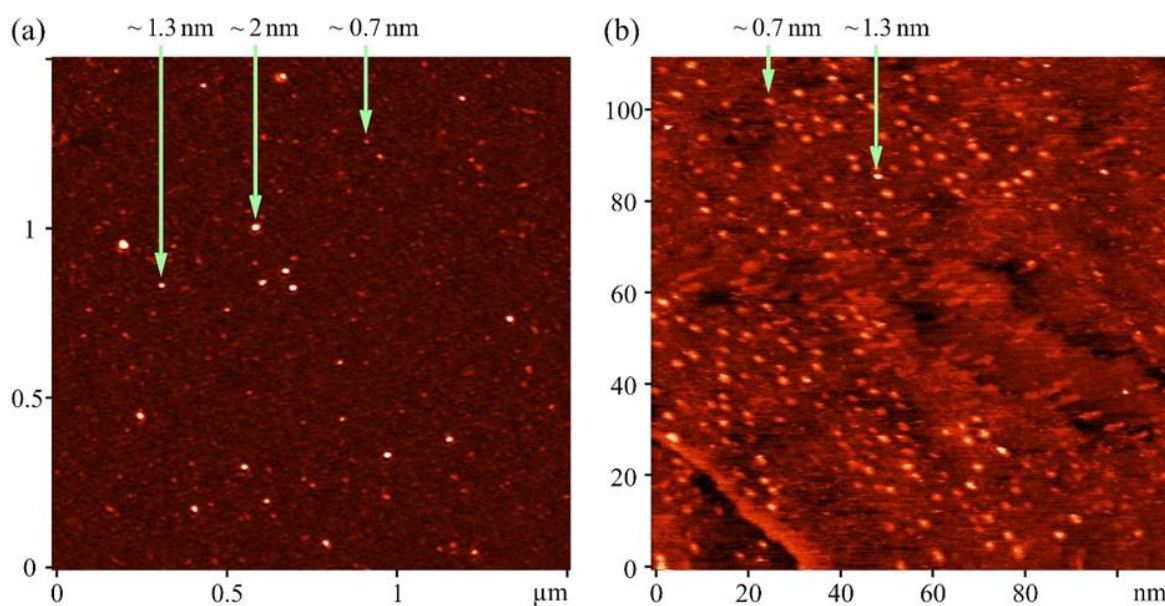


Рисунок 2.11. АСМ (а) та СТМ (б) зображення шару фулерену C_{60} . Числа зі стрілками показують висоту нанооб'єктів. Матеріал підкладки: слюда.

Дослідження, проведені з використанням атомно-силової мікроскопії, продемонстрували, що водні розчини фулерену C_{60} (C_{60} ФВР) мають полідисперсний характер. У складі таких систем виявляли як окремі молекули з діаметром приблизно 0,7 нм, так і більші агрегати, розмір яких коливався в межах 2–50 нм [25].

У межах проведеного експерименту C_{60} ФВР у концентрації 0,15 мг/мл вводили внутрішньочеревно в дозі 1 мг/кг маси тіла тварин. Вибір такої дози базувався на літературних даних, де повідомляється про високу біологічну

активність даного препарату, зокрема його протипухлинну та гепатопротекторну дію при застосуванні кумулятивних доз у межах 5–7,5 мг/кг [35,189].

Слід зазначити, що використана у нашому дослідженні доза C_{60} ФВР є значно нижчою за встановлений показник летальної дози (LD_{50}), який при пероральному введенні щурам становить 600 мг/кг маси тіла, що свідчить про достатній рівень безпеки застосованого підходу.

2.9. Статистична обробка результатів

Аналіз даних і всі графіки проводили за допомогою програмного забезпечення MedCalc Statistica версії 20.011 (Остенде, Бельгія). Аналіз і статистичну обробку даних баланографічних експериментів проводили в пакетах програм Clapmfit® 11.0.3, OriginPro 2018 та R 4.0.0 Documentation. Середнє (M) і стандартне відхилення (SD) або медіана (Me) і інтерквартильні діапазони (Q_{25} – Q_{75}) були розраховані відповідно до розподілу. Для статистичного аналізу ми використовували t -критерій Стюдента та непараметричні (U -критерій) тести Манна-Уїтні або Краскела-Уолліса з тестом Коновера для пост-гок порівнянь відповідно. Для кореляційного аналізу використовувався тест Спірмена. Двофакторний аналіз із повторними вимірюваннями ANOVA проводили з наступним тестом Тьюкі для багатьох порівнянь. Достовірними вважали різниці при $p < 0,05$.

Під час побудови графіків та аналізу результатів враховували як абсолютну, так і відносну похибки, які розраховували за стандартними формулами:

$$\text{Абсолютна похибка: } \Delta = \Delta_e + \Delta_c$$

де Δ_e та Δ_c - випадкове та систематичне відхилення, відповідно. Перше пов'язано з суб'єктом, друге – з точністю показників приладу.

При визначенні випадкового відхилення користувались наступною формулою:
$$\Delta_B = t \sqrt{\frac{\delta_1^2 + \delta_2^2 + \dots + \delta_n^2}{n(n-1)}}$$

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

Відносну похибку розраховували за наступною формулою: $\varepsilon = \frac{\Delta}{\langle x \rangle}$

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

Цифрові сигнали, отримані після трансформації аналогових даних за допомогою комплексу АЦП-ЦАП, обробляли шляхом згладжування із використанням фільтра на основі швидкого перетворення Фур'є (FFT) з коефіцієнтом згладжування $k = 5$. Така процедура дозволяла мінімізувати шумові компоненти та забезпечити чіткість відображення характеру м'язової відповіді.

Кожна графічна залежність, представлена у відповідних рисунках цієї роботи, є усередненим результатом 10–15 однотипних експериментальних повторень, що підвищує надійність та достовірність отриманих даних.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив водного розчину фулерену C_{60} на розвиток ниркової недостатності викликаной рабдоміолізічним пошкодження скелетних м'язів при гліцероловій моделі

Підвищення рівня креатиніну в крові в більшості випадків є ознакою ниркової недостатності та є головним показником ниркової недостатності при лабораторних дослідженнях для виявлення патології у сечостатевої системі [158,159]. Рівень креатиніну в крові при нирковій недостатності може підвищуватися в 2 рази (при 1 стадії), у 3рази (при 2 стадії), у 4 і вище рази (при 3 стадії) від вихідного рівня [160]. При цьому рівень креатиніну підвищується на раніше 48 годин після початку рабдоміолізу [161], тому зміну креатиніну ми фіксували на 3-гу добу після гліцеринової ін'єкції.

Внутрішньом'язове введення гліцерину привело до рабдоміолітичної ниркової недостатності, збільшення ступеня якої корегувало зі зростанням дози гліцерину та часом після його введення. В ході експерименту було встановлено, що після введення гліцерину виникала гостра ниркова недостатність, яка характеризувалася гіперкреатинінемією від 102 ± 3 мкмоль/л (за норми 50 мкмоль/л) при кількості гліцерину 5 мг/кг до 250 ± 5 мкмоль/л при кількості гліцерину 15 мг/кг (рис.3.1). Слід зазначити значне (до 100%) підвищення рівня креатиніну на протязі з 3 до 6 доби експерименту при всіх використаних дозах гліцерилу. Таким чином, рівень креатиніну на 6 добу при концентрації гліцерину 10 мг/кг відповідав його рівню на 9 добу при концентрації гліцерину 5 мг/кг та на 3 добу при концентрації гліцерину 15 мг/кг. Цей факт необхідно враховувати при розробці алгоритму аналогічних досліджень. Внутрішньочеревне введення розчину фулерену C_{60} привело до зниження рівня креатиніну на 25%, 38% та 47% (на 3,6 та 9 добу відповідно) при концентрації гліцерину 5 мг/кг. При збільшенні рівня рабдоміолізу, фулеренова терапія показувала менш якісні позитивні ефекти - 16%, 21% та 28% при 10 мг/кг гліцерину та 11%, 18% та

21% при 15 мг/кг гліцерину відповідно, що на нашу думку, пов'язано з недостатньою кількістю використаного антиоксиданту.

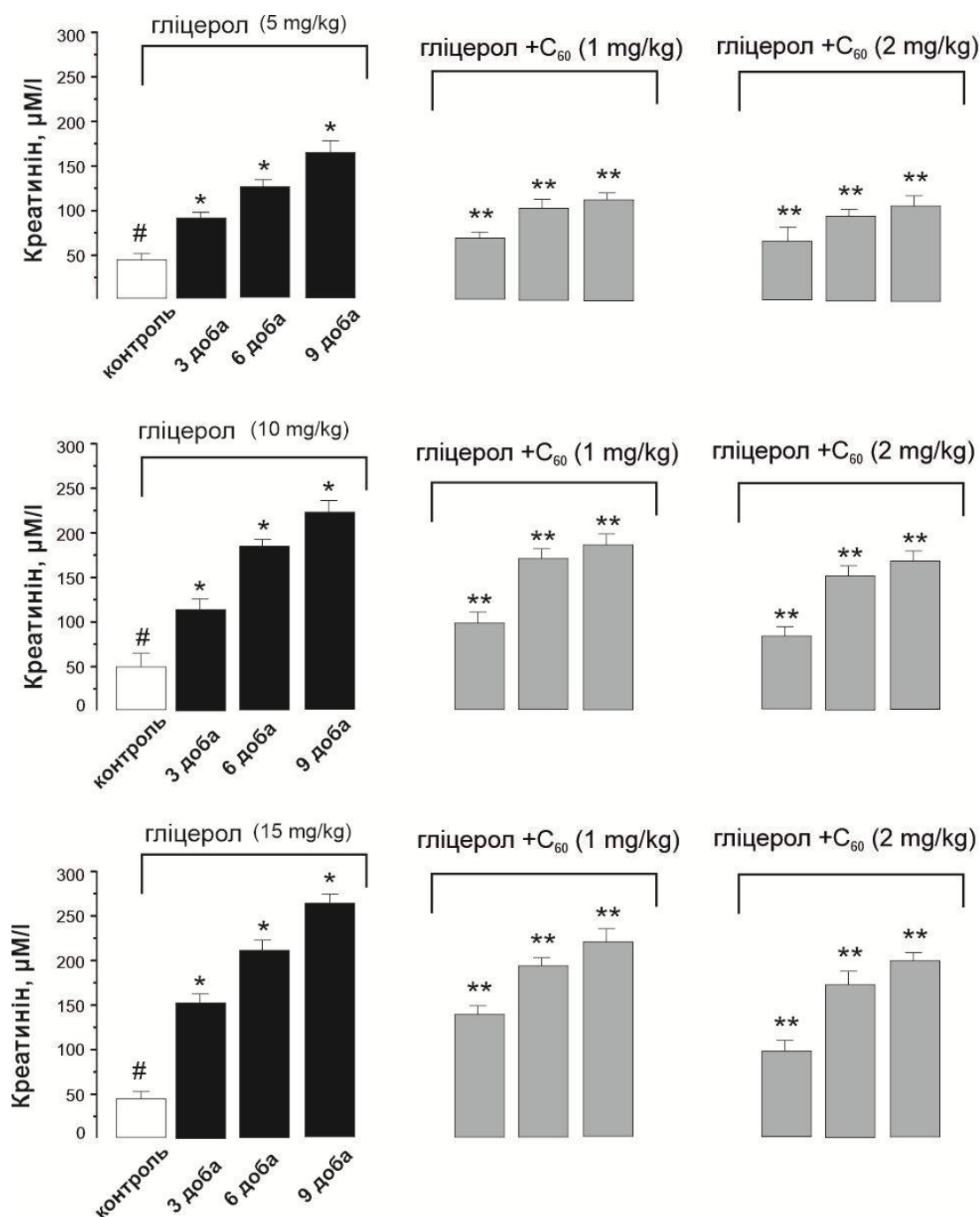


Рис.3.1 Показники рівня креатиніну при рабдоміолізованому пошкодженні нирок та введенні розчину фулерену C₆₀. * $p < 0.05$ щодо групи control; ** $p < 0.05$ щодо групи glycerol.

Отримані дані підтверджуються збільшенням терапевтичного впливу ін'єкцій фулерену C_{60} на 23% (2 стадія рабдоміолізу) та 26% (3 стадія рабдоміолізу) при збільшенні його концентрації до 2 мг/кг (рис.3.1).

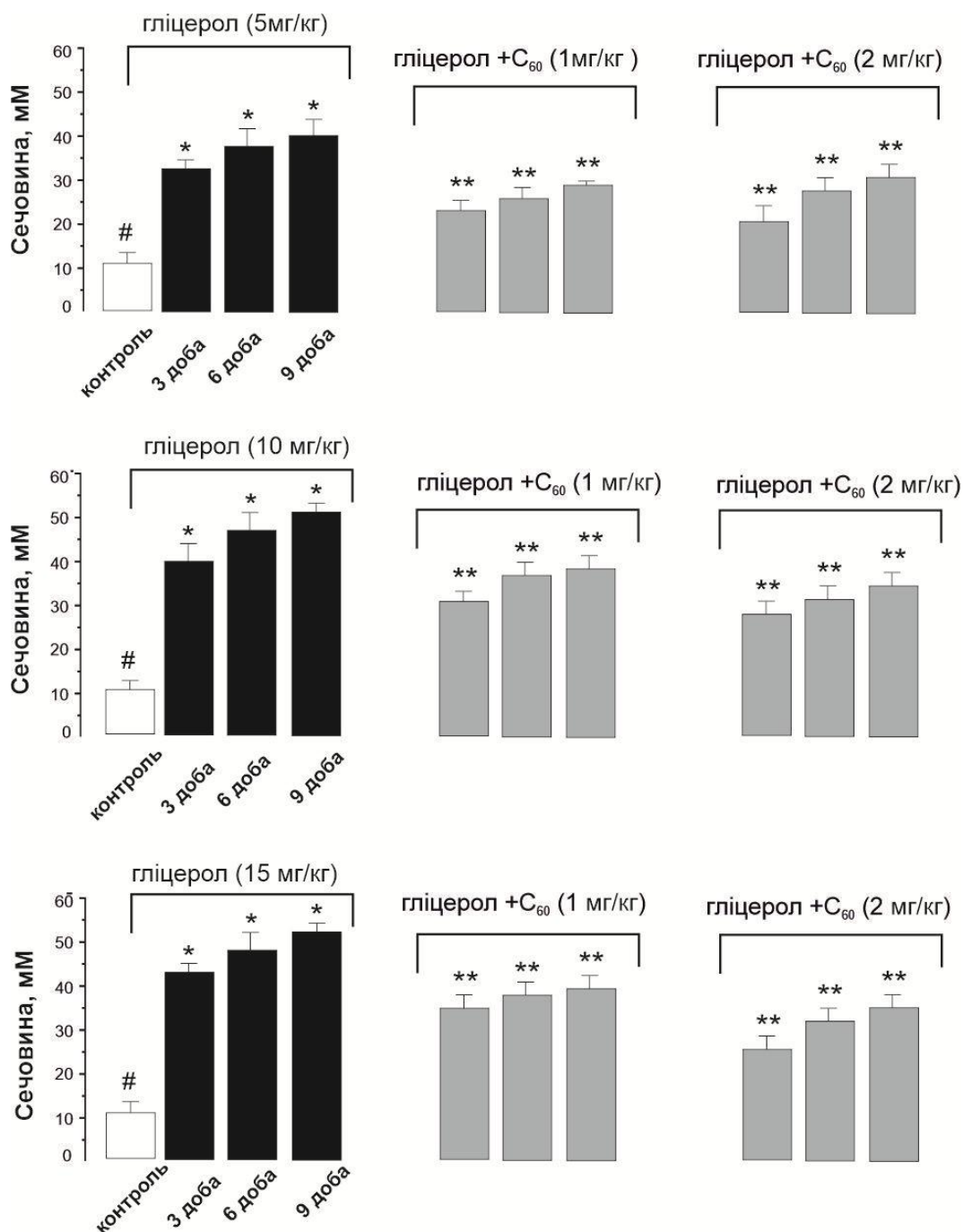


Рис.3.2 Показники рівня сечовини при рабдоміолізовому пошкодженні нирок та введенні розчину фулерену C_{60} . * $p < 0.05$ щодо групи control; ** $p < 0.05$ щодо групи glycerol.

Сечовина є одним із основних кінцевих продуктів обміну речовин, що містять азот, зокрема білків. Її синтез відбувається в печінці, після чого вона транспортується кровотоком до нирок, де фільтрується в клубочковому апараті та виводиться з організму із сечею.

Оскільки процес утворення та виведення сечовини є постійним, її певна базова концентрація постійно підтримується в плазмі крові. Проте за умов масового лізису клітин, зокрема при рабдоміолізі, рівень сечовини в крові значно зростає, що свідчить про активне вивільнення азотовмісних сполук унаслідок деструкції тканин.

Ниркова недостатність розвивається внаслідок зниження або повної втрати здатності ниркових клубочків ефективно фільтрувати метаболіти з крові. Одним із ключових біохімічних маркерів, що відображає стан клубочкової фільтрації, є рівень сечовини в крові. Зростання її концентрації є показовим критерієм порушення функціональної здатності нирок та слугує важливим діагностичним параметром при розвитку ниркової недостатності.

Ниркова недостатність проявляється при втраті здатності клубочка фільтрувати крізь себе метаболіти крові. Результат тесту на сечовину в крові є одним з основних показників якості клубочкової фільтрації при розвитку ниркової недостатності. Збільшення концентрації сечовини з 10 ± 05 мМоль/л в контролі до 32 ± 08 , 38 ± 04 та 41 ± 09 мМоль/л при ін'єкції гліцерину 5 мг/кг на 3, 6 та 9 добу експерименту показує наявність суттєвої ниркової недостатності вже при мінімальній використаній дозі гліцерину (рис.3.2).

Збільшення концентрації гліцерину в 2 та 3 рази (10 та 15 мг/кг відповідно) підвищило кількість сечовини в плазмі крові тільки на 19% та 14% відповідно. Ін'єкції фулерену C_{60} в концентрації 1 мг/кг зменшили кількість сечовини на 26%, 15% та 12% (5, 10 та 15 мг/кг гліцерину відповідно). При збільшенні концентрації фулерену до 2 мг/кг ці показники склали 35%, 28% та 21% відповідно, що свідчить про позитивну концентраційну залежність дії розчину фулерену C_{60} на процеси розвитку ниркової недостатності викликані процесами рабдоміолізу.

Швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) - показник, що найбільш точно відображає роботу нирок і характеризує їх стан. Це дуже важливий показник, оскільки за його допомогою можна оцінити здатність нирок виконувати свою основну функцію - очищати плазму та утворювати сечу.

При захворюваннях нирок ШКФ як правило, змінюється першим, ніж сечовина, креатинін чи аміак. За межами проксимального звивистого каналця, в товстій висхідній частині петлі Генле, сечовий міоглобін з'єднується з білком Тамма-Хорсфалла, утворюючи преципітат. Цей рН-залежний преципітат утворює трубчасті зліпки, що закупорюють дистальні каналці [161].

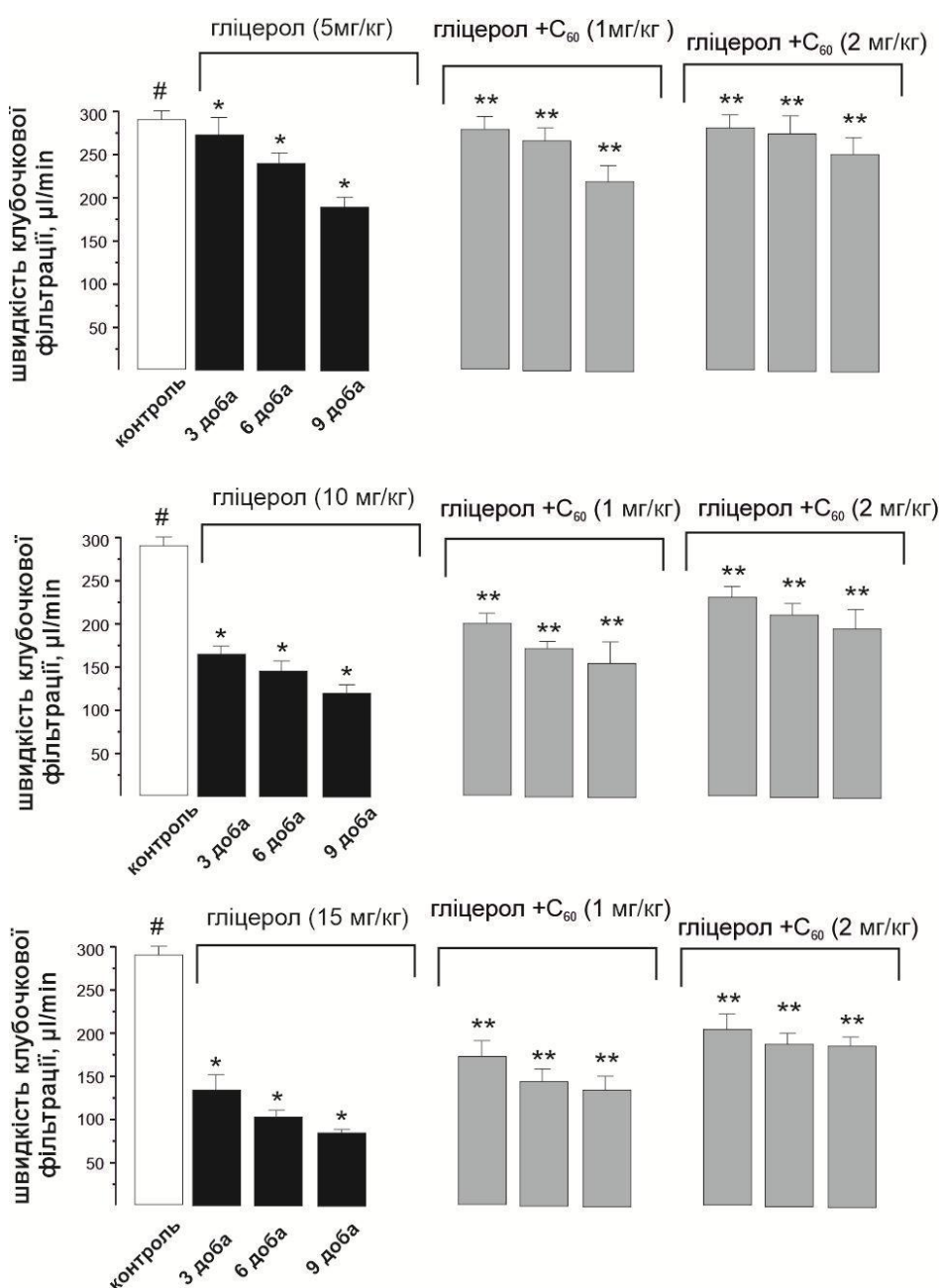


Рис.3.3 Швидкість клубочкової фільтрації при рабдоміолізованому пошкодженні нирок та введенні розчину фулерену C₆₀. *p<0.05 щодо групи control; **p<0.05 щодо групи glycerol.

Хоча ступінь залежності ГНН від цього механізму є спірним, вважається, що обструкція збільшує внутрішньоканальцевий тиск вище інтерстиціального, зменшуючи судинний приплив і перфузію, сприяючи запаленню та безпосередньо знижуючи швидкість клубочкової фільтрації за рахунок зміни сил Старлінга [162].

Внутрішньом'язове введення гліцерину привело до рабдоміолітичної ниркової недостатності та суттєвого зниження ШКФ, яке корегувало з збільшенням дози гліцерину та часом після його введення. За норми 290±7 мкл/хв при введенні гліцерину 5 мг/гк ШКФ зменшилась до 270±9, 249±12 та 195±11 мкл/хв на 3,6 та 9 добу відповідно, що було вище на 15 – 24 % від контрольних показників і, таким чином, дана концентрація гліцерину призвела до ГНН легкого ступеня важкості.

При збільшенні дози гліцерину до 10 мг/гк ШКФ знизилось на 41 %, 47 % та 52 % на 3, 6 та 9 добу відповідно, що відповідає важким патологічним змінам в сечовидільній системі. Збільшення дози гліцерину до 15 мг/кг зменшило рівень ШКФ ще на 12, 15 та 19% , що зменшило ШКФ майже до 20 % від контрольних значень (рис.3.3)

Внутрішньочеревне введення розчину фулерену C₆₀ в моделі легкої ГНН (гліцерин 5 мг/кг) призвело до незначного підвищення ШКФ на 6, 9 та 11% (на 3,6 та 9 добу відповідно) порівняно із експериментальними групами. Підвищення дози фулерену в 2 рази (2 мг/кг) майже не змінила рівень терапевтичного ефекту (рис.2.3). При ГНН важкого ступеня (гліцерин 10 мг/кг) рівень терапевтичного ефекту фулерену C₆₀ склав 12,14 та 15%, а при підвищенні дози фулерену до 2 мг/кг – 21, 27 та 32% відповідно. Найбільш якісні терапевтичні афекти спостерігалися при ін'єкціях гліцерину в дозі 15 мг/кг. Збільшення ШКФ склало 14, 17 та 19% при дозі фулерену 1мг/гк та 29, 38 та 51%

при збільшенні дози фулерену до 2мг/кг порівняно із експериментальними групами без застосування фулерену. Таким чином, ін'єкції фулерену найбільш якісно впливали на збільшення рівня ШКФ при рабдоміолічному ГНН важкого ступеня та при дозі 2 мг/кг.

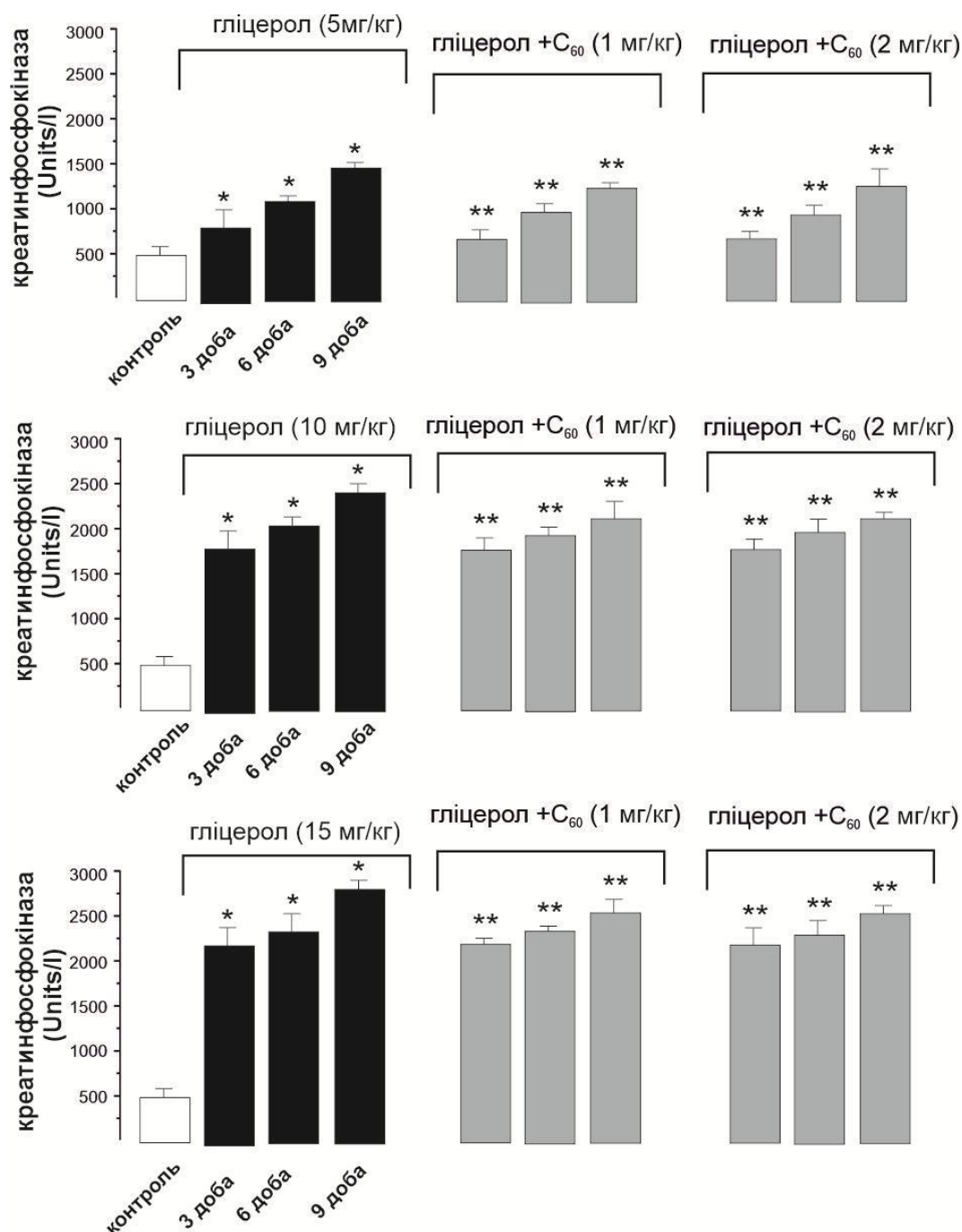


Рис.3.4 Рівень креатинфосфокінази при рабдоміолічному пошкодженні нирок та введенні розчину фулерену C₆₀. *p<0.05 щодо групи control; **p<0.05 щодо групи glycerol.

Найчастіше використовуваним клінічним тестом на рабдоміоліз є вимірювання рівня креатинкінази (КФК) у плазмі [163]. КФК також є стандартним лабораторним біомаркером для діагностики та оцінки тяжкості руйнування скелетних м'язів при пораненнях військовослужбовців та сильно корелює з ризиком ГНН [164].

Підвищені рівні КФК неодноразово асоціювалися з гострою нирковою недостатністю та необхідністю замісної ниркової терапії у пацієнтів з рабдоміолізними пошкодженням скелетних м'язів. В проведених дослідженнях підвищення рівня КФК вже при ГНН легкого ступеня важкості (гліцерин 5 мг/кг) збільшилося на 21,49 та 112% (на 3,6 та 9 добу відповідно) від контрольних значень. Фулеренова терапія в дозі 1 мг/кг призвела до зменшення кількості КФК на 14,18 та 19% відповідно, а підвищення дози фулерену до 2 мг/кг достовірно не змінювала ці показники (рис.3.4).

ГНН важкого ступеня важкості (гліцерин 10 мг/кг) призвело до підвищення рівня КФК на 357, 404 та 434% відповідно. Ін'єкції фулерену в дозі 1 мг/кг знижували вміст КФК тільки на 7% на 6 добу, на 14 % на 9 добу експерименту. Підвищення дози фулерену до 2 мг/кг достовірно не змінювало ці показники. Збільшення кількості гліцерину до 15 мг/кг підвищило вміст КФК на 9-17% а ін'єкції фулерену зменшили її кількість на 12% тільки на 9 добу експерименту. На нашу думку, це можливо пояснити тим фактом, що дія фулерену C_{60} на зменшення процесів руйнації м'язових клітин лінійно зменшується зі збільшенням часу від початку терапії. Ін'єкції фулерену після 2 діб після ініціації м'язового пошкодження майже не впливають на рівень руйнації міоцитів. Таким чином, в даному досліді дія фулерену C_{60} на процеси рабдоміолізного пошкодження м'язових клітин майже відсутня.

Враховуючи, що однією з ключових ланок ушкодження ниркового епітелію при гліцериновій нефропатії є пероксидація ліпідів, котра виникає на 2-3-4 добу після ініціації патології, можна стверджувати про позитивну дію ін'єкцій фулерену C_{60} саме на ці процеси, а саме на гіповолемією, інтралюмінальну закупорку міоглобіном та його токсичною дією, так як в цих

процесах вивільняються велика кількість АФК, що призводить до збільшення вільнорадикального окислення [164].

Одним з кількісних показників ступеня розвитку НН є оцінка транспорту натрію, оскільки механізм вільнорадикального гальмування реабсорбції за розвитку рабдоміолізу пов'язаний з пригніченням натрій-калієвої АТФазної транспортної системи. Крім того, саме зміну транспорту натрію за розвитку НН пов'язують зі зміною вмісту ЛПНЩ у крові [165].

Внутрішньом'язове введення гліцерину викликало розвиток рабдоміоліз-асоційованої гострої ниркової недостатності (ГНН), ступінь якої посилювався пропорційно до збільшення дози препарату та часу, що минув з моменту ін'єкції.

Один із ключових функціональних показників ниркового транспорту, фракційна екскреція натрію (FENa), зросла з контрольного рівня 0,4% до 1,3%, 1,5% та 1,9% на 3, 6 та 9 добу відповідно після введення гліцерину в дозі 5 мг/кг.

Внутрішньочеревне введення водного розчину C60 у дозі 1 мг/кг сприяло зниженню показника фракційної екскреції натрію (FENa) на 9–13%. Збільшення дози до 2 мг/кг призвело до незначного посилення ефекту — додаткове зниження FENa становило лише 4–5% протягом експериментального періоду (рис. 3.5).

Зростання дози гліцерину до 10 і 15 мг/кг супроводжувалося додатковим збільшенням FENa на 15–18% і 11–15% відповідно порівняно з контролем. У цих умовах застосування водного розчину C₆₀ знижувало FENa на 14–17% при дозі 1 мг/кг і на 22–28% при дозі 2 мг/кг, що свідчить про виражений захисний ефект антиоксиданту (рис. 3.5). Найбільш виражена терапевтична дія спостерігалася при дозі 2 мг/кг на 9-ту добу після індукції рабдоміолізу.

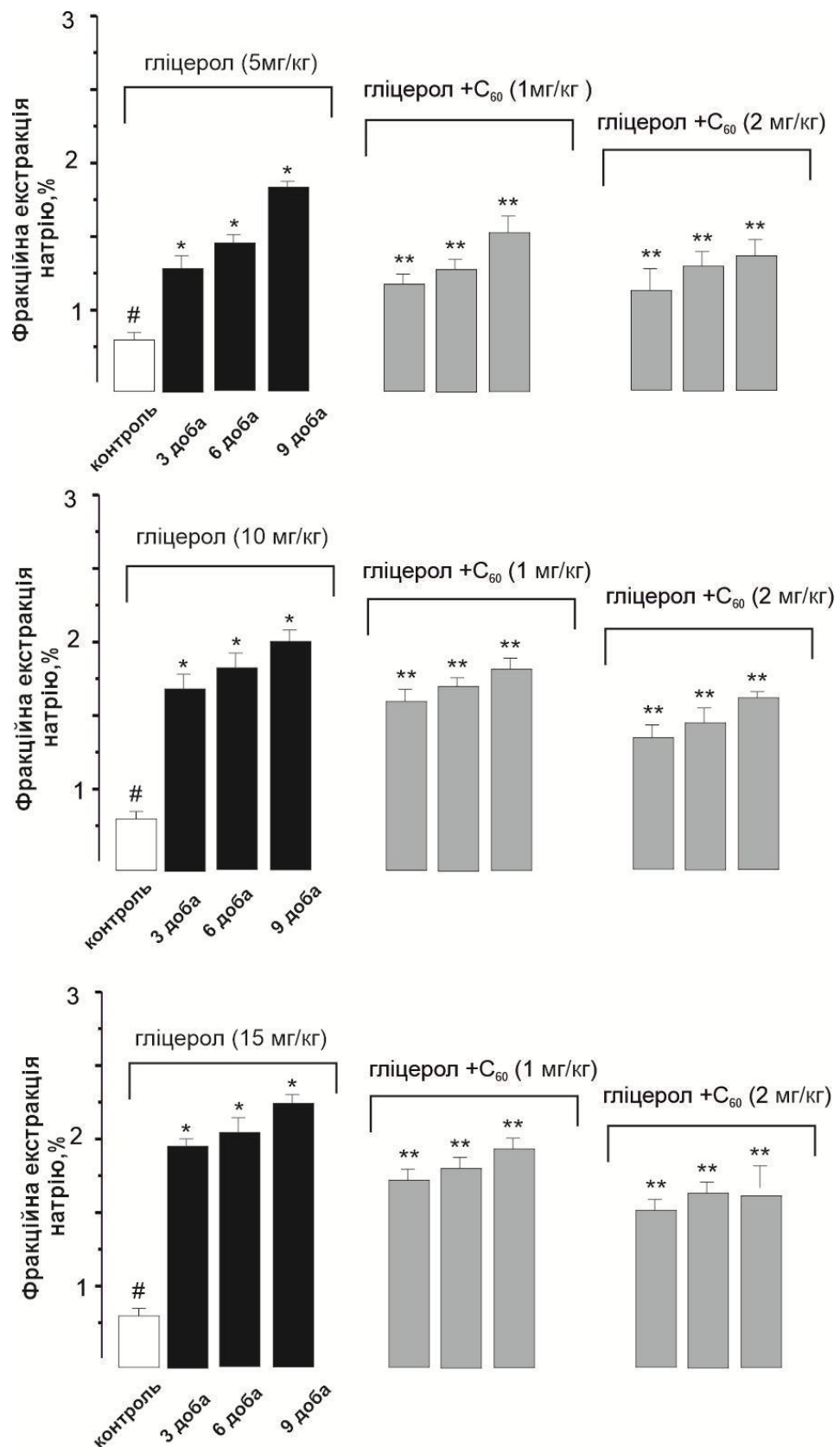


Рис. 3.5. Зміна величини FE_{Na} при рабдоміолізованому пошкодженні нирок та введенні водного розчину C_{60} . * $p < 0.05$ щодо групи контроль; ** $p < 0.05$ щодо групи «гліцерин».

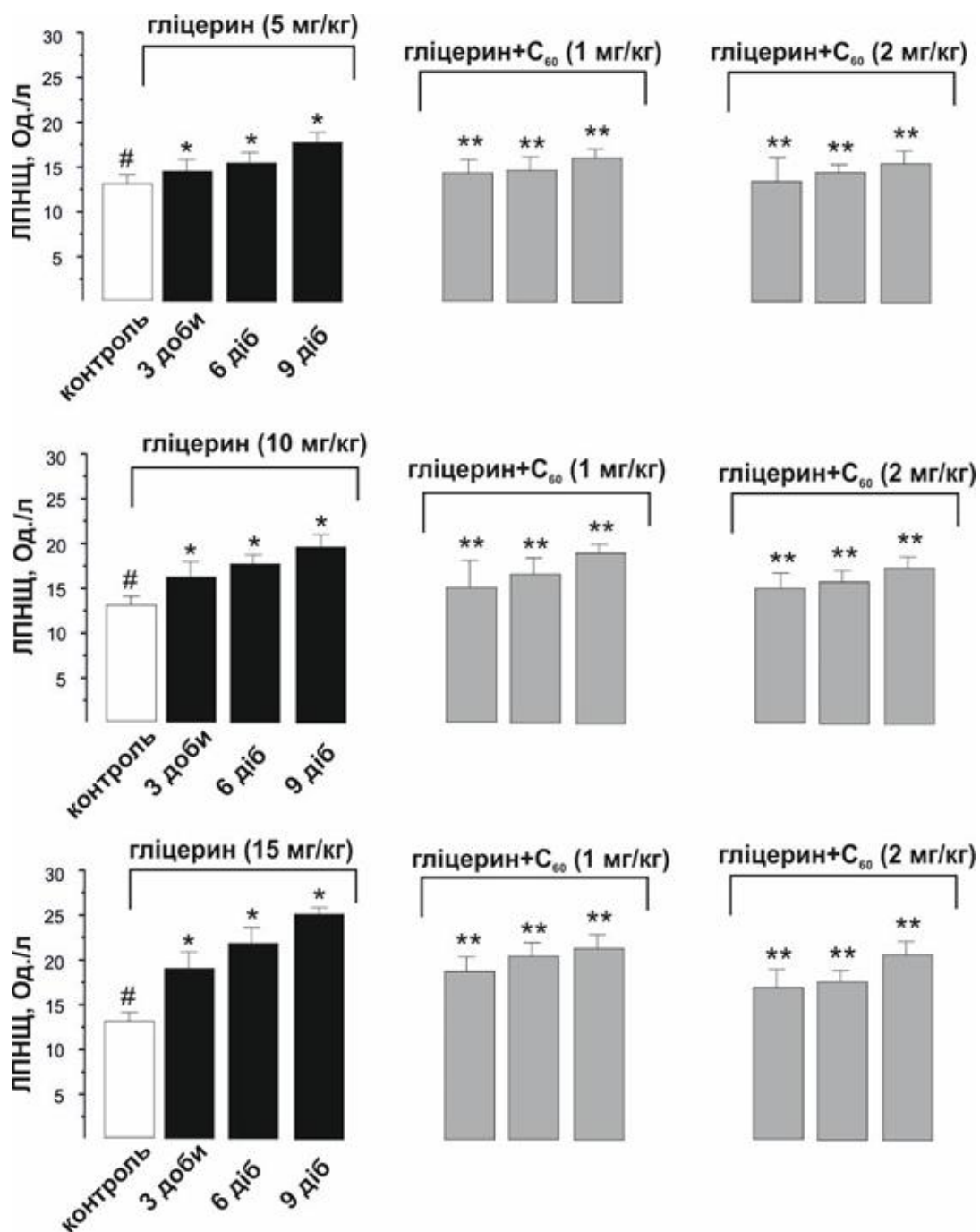


Рис. 3.6 Вміст ЛПНЩ у плазмі крові щурів при рабдоміолізованому пошкодженні нирок та введенні водного розчину C₆₀. *p<0.05 щодо групи контроль; **p<0.05 щодо групи «гліцерин».

Оцінка вмісту ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) показала зростання їх концентрації на 3–5% після введення гліцерину в дозі 5 мг/кг. При цьому застосування C_{60} у дозах 1 і 2 мг/кг дозволило нормалізувати рівень ЛПНЩ до контрольних значень протягом експерименту (рис. 3.6).

При дозі гліцерину 10 мг/кг вміст ЛПНЩ збільшувався на 7–15% порівняно з контролем. Ін'єкції C_{60} у дозі 1 мг/кг знижували цей показник на 6–9%, тоді як подвоєння дози до 2 мг/кг не приводило до суттєвого посилення ефекту.

Найбільш виражені зміни спостерігалися при дозі гліцерину 15 мг/кг: рівень ЛПНЩ зростав на 27% і 49% на 3-тю та 9-ту добу відповідно. У цих умовах фулерен C_{60} у дозі 1 мг/кг зменшував рівень ЛПНЩ на 11–18%, а доза 2 мг/кг забезпечувала додаткове зниження ще на 6–8% порівняно із експриментальними групами.

У середньому, ін'єкції C_{60} у дозі 1 мг/кг знижували концентрацію ЛПНЩ на 13–18%. Подвоєння дози демонструвало помірне посилення ефекту лише на пізніх етапах патологічного процесу при тяжких формах рабдоміолізу.

3.2. Оцінка показників про- та антиоксидантного балансу.

Під час розвитку рабдоміолізу надмірна кількість міоглобіну вивільняється в кровоток з м'язових клітин, а вільний міоглобін фільтрується бар'єром клубочкової фільтрації та ендочитується клітинами ниркових каналців. Залізовмісний міоглобін усередині трубчастих клітин окислюється до тривалентної форми, що призводить до утворення гідроксильного радикалу з подальшим перетворенням тривалентного міоглобіну на залізистий міоглобін за допомогою окислювально-відновного циклу з утворенням радикальних частинок. Ці радикали призводять до перокисного окислення ліпідів та надмірного окислювального стресу. У механізмах регуляції вільнорадикальних і пероксидних процесів ключову роль відіграють ферменти антиоксидантного захисту, такі як каталаза (CAT) та супероксиддисмутаза (SOD). Найпотужнішим природним антиоксидантом і ферментом першої ланки антиоксидантного

захисту є супероксиддисмутаза, яка здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і перетворює їх на менш реакційно здатні молекули пероксиду водню. Подальше розкладання пероксиду водню на воду та молекулярний кисень здійснюється каталазою, тому активність даних ферментів дає змогу прослідкувати зміни про- і антиоксидантного балансу.

Отримані дані чітко демонструють підвищений рівень маркерів перекисного окислення та окислювального стресу після виникнення ниркової недостатності та їх зниження при застосуванні ін'єкцій водного розчину фулерену C₆₀.

Рівень SOD підвищився на 121, 142 та 167% при 1,2 та 3 схемі введення гліцерину (5, 10 та 15 мг/кг гліцерину відповідно), що підтверджує наші данні про незначне збільшення рабдоміолізу при збільшенні кількості введеного гліцерину. Застосування водного розчину фулерену в концентрації 1мг/кг C₆₀ зменшило ці показники на 21, 26 та 32%, а при збільшенні концентрації C₆₀ до 2 мг/кг прослідковується суттєвий додатковий ефект який склав 14, 19 та 21% відповідно (рис.3.7). Рівень активності САТ збільшився з $0,9 \pm 0,1$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{m}$ у контролі до $4,1 \pm 0,3$, $5,2 \pm 0,4$, $5,9 \pm 0,6$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{m}$ (5, 10 та 15 мг/кг гліцерину відповідно).

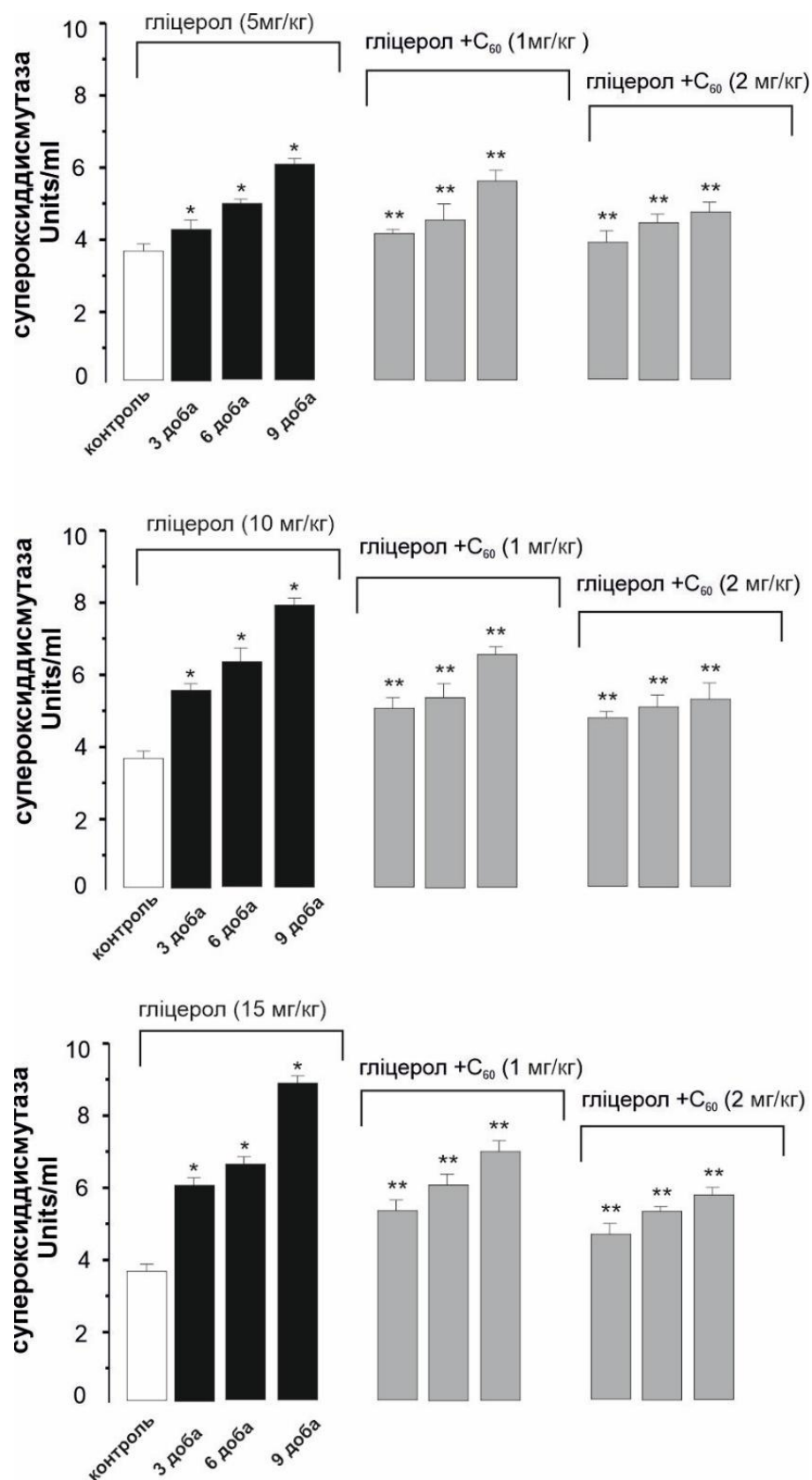


Рис.3.7. Рівні SOD у крові щурів при рабміолізному пошкодженні нирок та введенні розчину фулерену C₆₀. *p<0.05 щодо групи control; **p<0.05 щодо групи glycerol.

Після ін'єкцій фулереном C_{60} її рівень активності знизився до $3,2 \pm 0,4$, $4,2 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,3$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{m}$ відповідно. При збільшенні концентрації до 2 мг/кг додатковий позитивний ефект склав 11, 13 та 16% відповідно (рис.3.8).

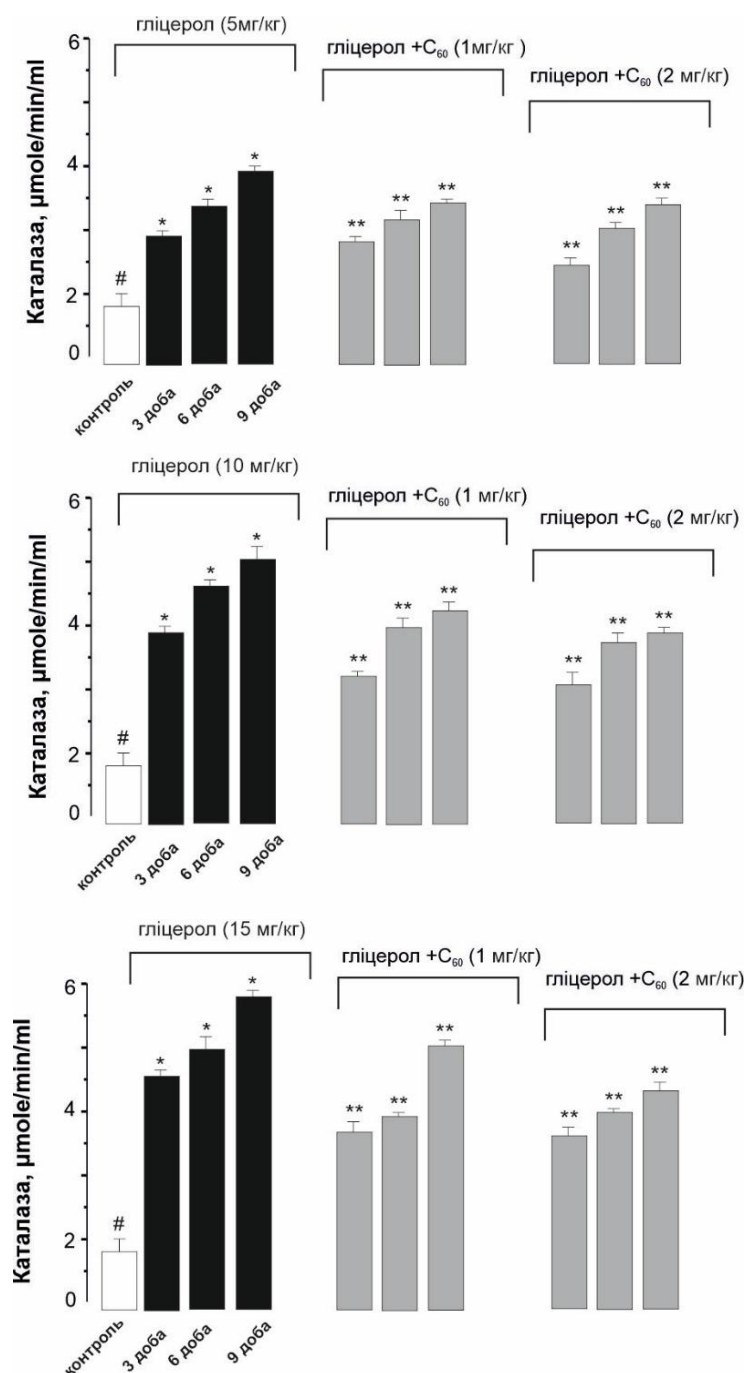


Рис.3.8. Рівні САТ у крові щурів при рабміолізному пошкодженні нирок та введенні розчину фулерену C_{60} . * $p < 0.05$ щодо групи control; ** $p < 0.05$ щодо групи glycerol.

Таким чином, простежується чітка тенденція до зменшення описаних біохімічних параметрів приблизно на 20-30 % при використанні ін'єкцій водного розчину C_{60} фулеренів в концентрації 1 мг/кг, та ще на 12-15% при збільшенні його концентрації до 2 мг/кг.

На основі отриманих даних можна стверджувати, що загальноприйняту модель токсичного гліцеринового рабдоміолізу яка здійснюється внутрішньом'язовим введенням 50% розчину гліцерину в концентрації 10 мг/кг і яку використовують для викликання гострої ниркової недостатності можливо вдосконалити.

З отриманих даних видно, що введення гліцерину в окремий м'яз дає змогу зменшити кількість використаного гліцерину в 2 рази. Також, рівень ниркової недостатності при токсичному гліцериновому рабдоміолізі залежить від часу після ініціації патології. Нові антиоксидантні методи впливу на розвиток ниркової недостатності показали ефективність ін'єкцій водного розчину фулерену, який здатний нейтралізувати шкідливу дію міоглобіну.

Це підтверджують також отримані раніше дані щодо впливу водорозчинних C_{60} фулеренів на функції антиоксидантної систем організму при запальних та патологічних процесах. Таким чином, поки не з'являться нові специфічні методи лікування ниркової недостатності використання класичної антиоксидантної підтримуючої терапії є адекватним підходом, а розробка медичних нанотехнологій на основі водорозчинних C_{60} фулеренів з урахуванням їх потужних антиоксидантних властивостей, відкриває нові можливості у лікуванні та профілактиці ниркової недостатності викликаній рабдоміолізним пошкодженням скелетно-м'язової системи.

Для підтвердження даного припущення ми проаналізували зміну рівня глутатіонпероксидази - ферменту, який захищає організм від окисного ушкодження каталізуючи відновлення гідроперекисів ліпідів у відповідні спирти та відновлення пероксиду водню до води.

Рівень глутатіонпероксидази зменшувався приблизно на 20,43 та 67% при збільшенні концентрації гліцерину з 5 до 15 мг/кг відповідно (рис.3.9). Ін'єкції фулерену C₆₀ в дозі 1 мг/кг показали позитивний ефект на рівні 18, 27 та 39% відповідно, який збільшувався на 11, 17 та 24% при збільшенні концентрації фулерену до 2 мг/кг.

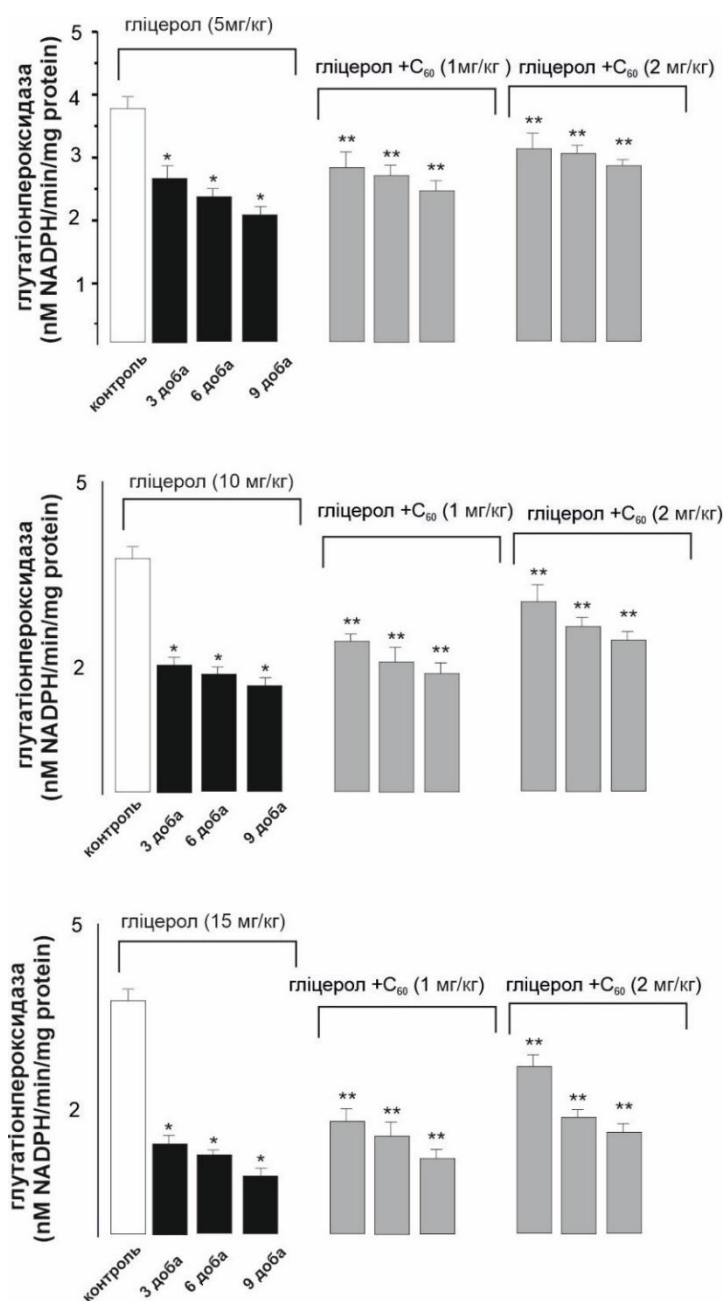


Рис.3.9. Рівень глутатіонпероксидази при рабміолізному пошкодженні нирок та введенні розчину фулерену C₆₀. *p<0.05 щодо групи control; **p<0.05 щодо групи glycerol.

З отриманих даних видно, що показники змін активності глутатіонпероксидази чітко корелювали зі змінами швидкість клубочкової фільтрації при використанні фулеренових ін'єкцій.

Таким чином, аналіз показників плазми крові, змін рівнів про- та антиоксидантного балансу дає можливість стверджувати, що застосування водорозчинних C_{60} фулеренів, як потужних антиоксидантів, запобігає негативному впливу АФК на клітинні та субклітинні процеси розвитку гострої ниркової недостатності, ініційованої рабдоміолізом скелетних м'язів. Це відкриває нові можливості в терапії патологічних станів, в основі яких лежить дія вільнорадикальних процесів.

3.3. Кореляційний аналіз ступеня ниркової дисфункції із станом антиоксидантних систем

Далі ми провели кореляційний аналіз між біохімічними маркерами ниркової дисфункції та активністю SOD і CAT (рис. 3.10). Активність SOD, активність CAT і концентрацію креатиніну в плазмі виражали як кратну зміну на 3-й, 6-й і 9-й день після ін'єкції гліцерину в дозах 5, 10 і 15 мг/кг і наносили на рис. 4а,с. На рис. 3.10 b, d показано результати регресійного аналізу об'єднаних точок даних, які показали коефіцієнт кореляції Пірсона 0,974 у випадку співвідношення концентрація креатиніну-активність СОД і 0,973 у випадку співвідношення концентрація креатиніну-активність САТ, що вказує на тісний кореляційний зв'язок між активність цих ферментів і тяжкість гострого ураження нирок. Нахил цього співвідношення був дещо крутішим ($3,38 \pm 0,25$) для активності SOD порівняно з активністю CAT ($2,04 \pm 0,15$).

Подібний аналіз проводили з метою кількісної характеристики зв'язку між змінами концентрації сечовини в плазмі та активністю СОД і КАТ (рис. 3.11). Знову ж таки, спостерігався тісний кореляційний зв'язок між тяжкістю гострого ураження нирок та активністю СОД і КАТ. Нахили цього співвідношення були подібними у випадку сечовини: ($1,49 \pm 0,21$) для активності SOD і $1,23 \pm 0,10$ для активності САТ.

Далі ми розглянули питання про те, як лікування фулереном C_{60} може вплинути на ці залежності. Для цього об'єднані дані за 3, 6 і 9 дні, отримані до обробки фулереном C_{60} , були нанесені на рис. 3.12. Можна побачити, що хоча фулерен C_{60} не змінював співвідношення між концентраціями креатиніну або сечовини та активністю SOD і CAT (зауважте, що точки даних практично перекриваються), він спричиняв значне зниження максимальних значень усіх цих параметрів.

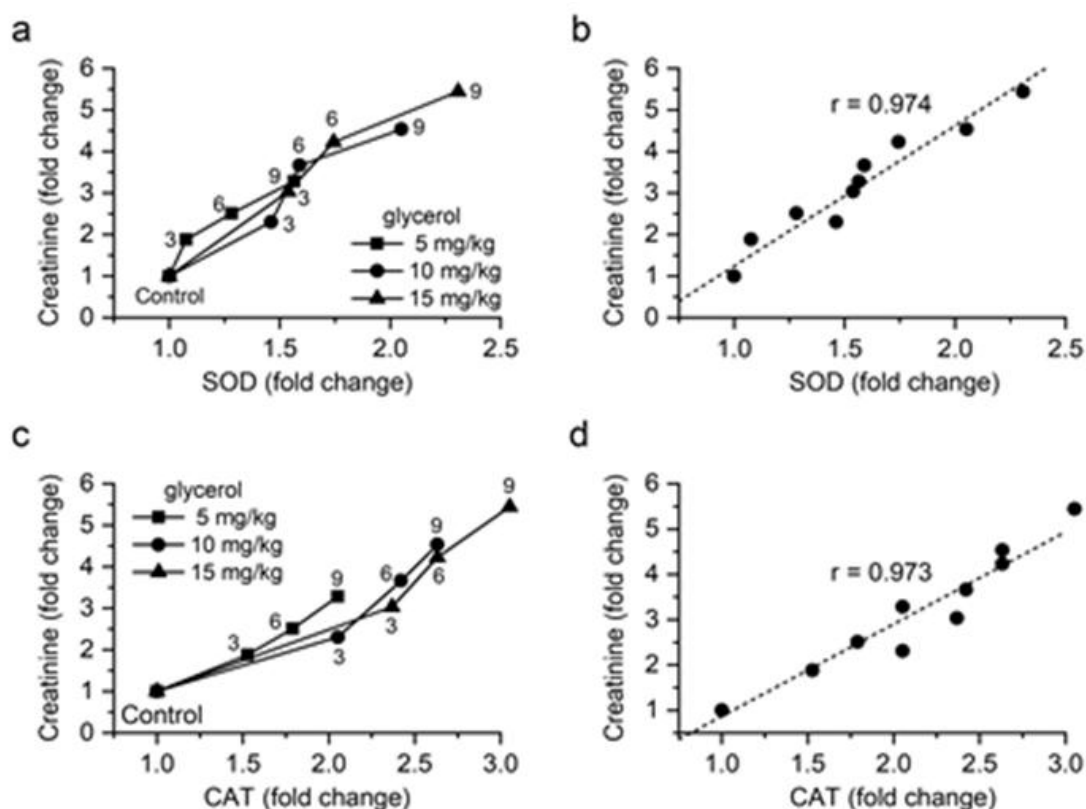


Рис. 3.10 Кореляційний аналіз ступеня ниркової дисфункції, оціненої як кратність зміни концентрації креатиніну в плазмі та активності СОД (a, b) і САТ (c, d). a b, цифри біля кожного символу вказують на день експерименту. c & d, комбіновані дані за всі дні експерименту були піддані аналізу лінійної регресії (пунктирні лінії) із зазначеними значеннями r Пірсона.

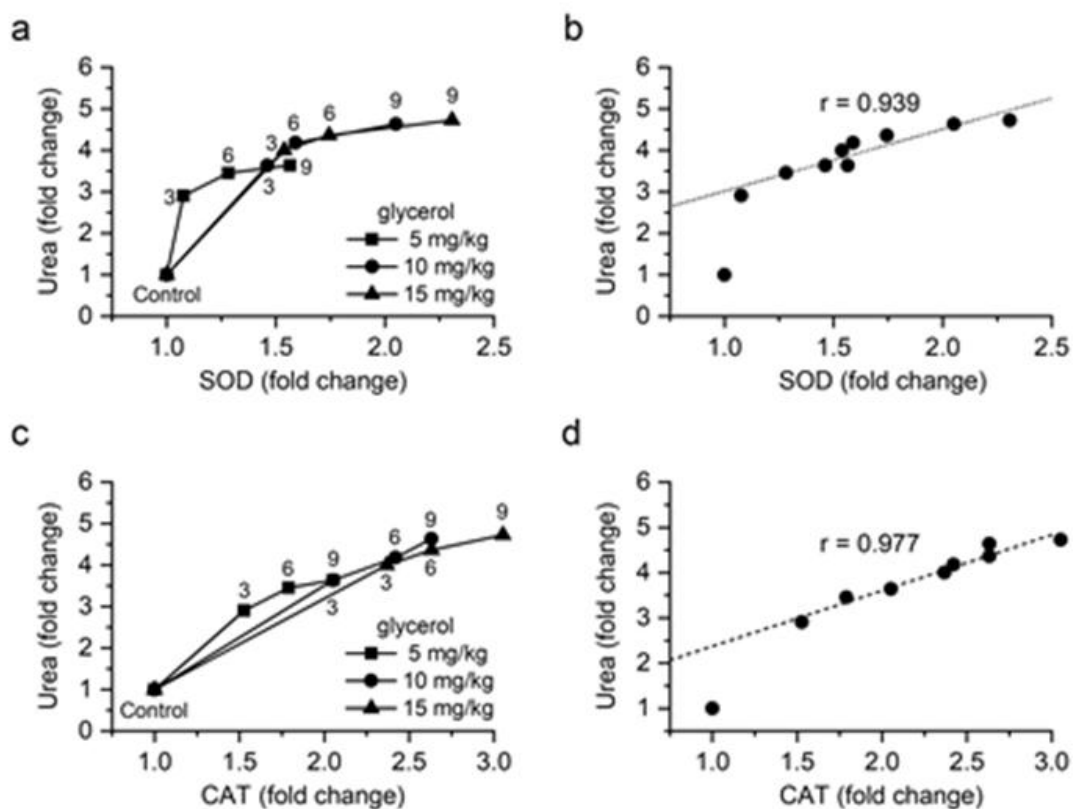


Рис. 3.11 Кореляційний аналіз ступеня ниркової дисфункції, оціненої як кратність зміни концентрації сечовини в плазмі та активності СОД (а, б) і САТ (с, д). а, б, цифри біля кожного символу вказують на день експерименту. с, д, комбіновані дані за всі дні експерименту були піддані аналізу лінійної регресії (пунктирні лінії) із зазначеними значеннями r Пірсона.

Зазначимо, що ці результати добре корелюють з раніше визначеними даними щодо впливу водорозчинних фулеренів C60 на антиоксидантну систему при запальних та патологічних процесах.

Активність антиоксидантних ферментів, включаючи САТ, СОД і глутатіонпероксидазу (GPx), часто розглядають як біомаркери окисного стресу, регуляція якого важлива для збереження нормальної функції клітин і гомеостазу в умовах окисного стресу [27]. Однак, зв'язок між окислювальним стресом і активністю антиоксидантних ферментів є складним, тому необхідні майбутні дослідження для вивчення ролі окислювального стресу в гострому ураженні нирок внаслідок рабдоміолізу.

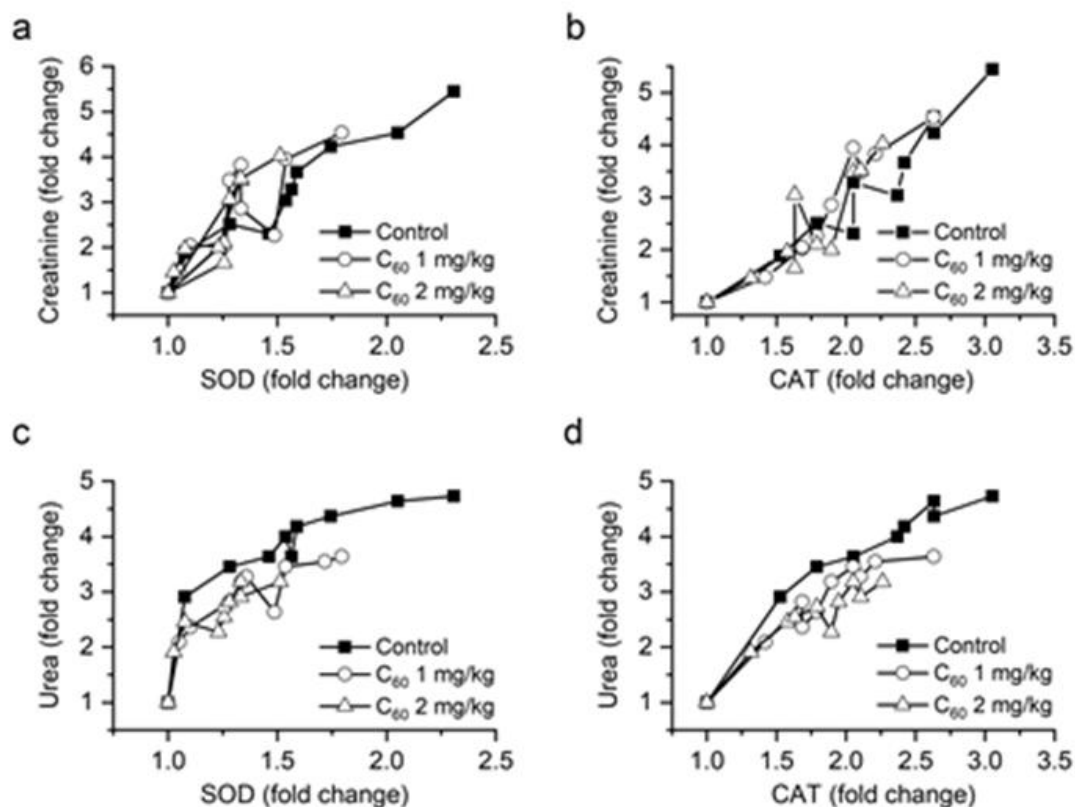


Рис. 3.12 Кореляційний аналіз ступеня порушення функції нирок, оціненого як кратність зміни концентрації креатиніну (а, б) і сечовини (с, д) у плазмі крові та активності SOD (а,с) і CAT (б,д) у контролі (заштриховані квадрати) і після введення фулерену C_{60} у 1 (незафарбовані кружечки) і 2 (заштриховані трикутники) мг/кг, як зазначено.

Швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) є ключовим індикатором функціонального стану нирок, який дозволяє оцінити їх здатність до очищення крові від продуктів метаболізму та формування сечі. При розвитку ниркових патологій саме ШКФ зазнає змін раніше, ніж інші біохімічні маркери, такі як креатинін чи сечовина, що робить її особливо чутливим показником на ранніх стадіях захворювання.

У випадках рабдоміолізу один із важливих факторів зниження ШКФ пов'язаний з осіданням міоглобіну в нефроні. Зокрема, за межами

проксимального звивистого каналця, у товстому висхідному відділі петлі Генле, міоглобін з'єднується з білком Тамма-Хорсфалла (уромодуліном), утворюючи рН-залежний преципітат. Цей комплекс формує білкові зліпки, які обструкціюють просвіт дистальних каналців.

Вважається, що така обструкція сприяє підвищенню внутрішньоканальцевого тиску, що перевищує інтерстиціальний. Це призводить до зниження капілярної перфузії, розвитку ішемії, активації запальних процесів та, як наслідок, зниження ШКФ. У патогенезі цих змін значну роль відіграють порушення гідростатичних та онкотичних градієнтів — так званих сил Старлінга.

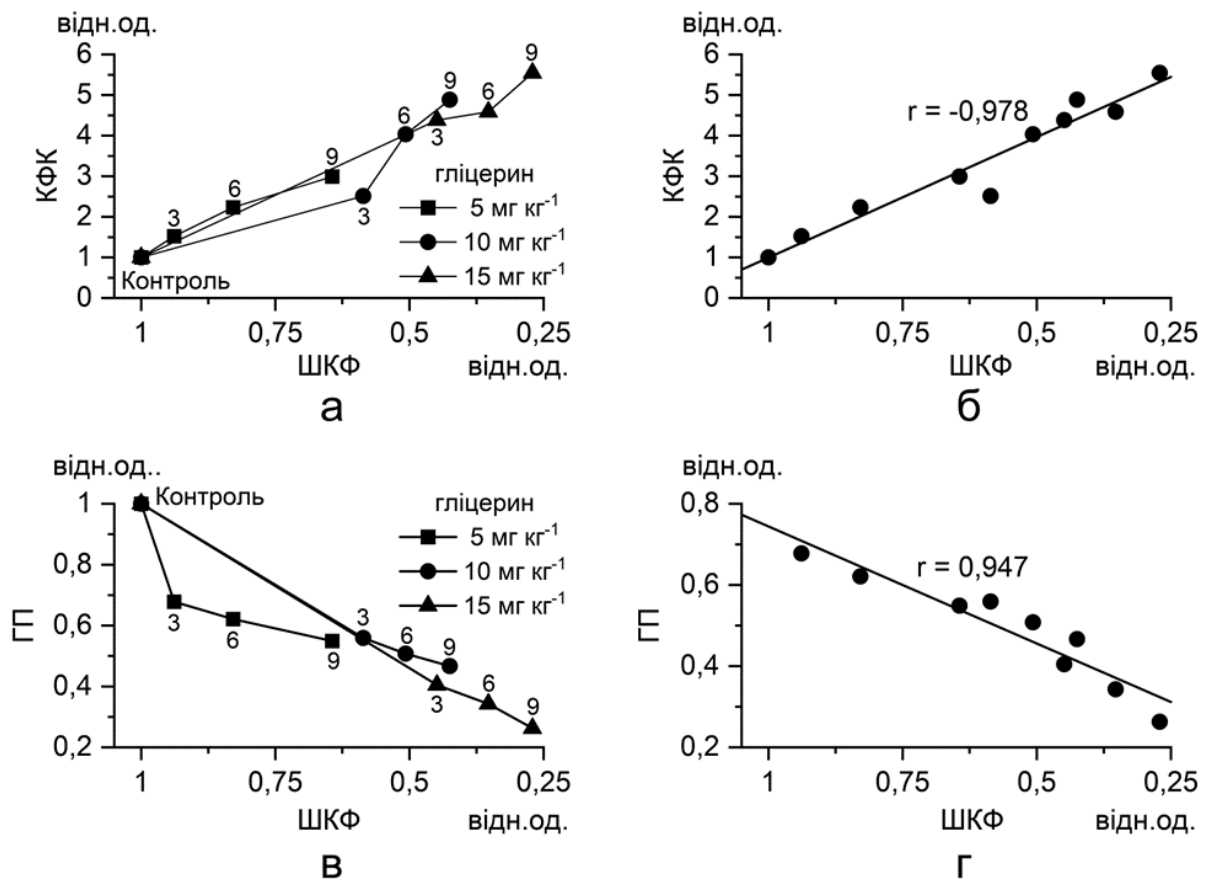


Рис. 3.13. Кореляційний аналіз ступеня ниркової дисфункції, оціненої як кратність зміни швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), та змінами креатинфосфокінази (КФК; а, б) і активності ГП (в, г): цифри біля кожного символу вказують на день експерименту (а, в); об'єднані результати за всі дні

експериментів були проаналізовані за допомогою лінійної регресії (прямі лінії) із зазначеними коефіцієнтами кореляції Пірсона (б, г).

На рисунку 3.13 представлено результати кореляційного аналізу між ступенем ниркової дисфункції, вираженим як кратне зниження швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), та змінами у рівнях креатинфосфокінази (КФК; а, б) і активності глутатіонпероксидази (ГП; в, г). Цифри, розміщені біля кожного символу на графіках (а, в), відповідають дням експерименту. Для комплексної оцінки було проведено лінійну регресію на об'єднаних даних за всі дні дослідження, з побудовою регресійних прямих та зазначенням коефіцієнтів кореляції Пірсона (графіки б, г).

Результати свідчать про наявність чіткої залежності між динамікою рівня КФК, активністю ГП та змінами ШКФ при застосуванні водного розчину C_{60} . Встановлено, що обидва показники добре корелюють із функціональним станом нирок (рис. 3.13, 3.14).

Нахили прямих ліній регресії свідчать про різну чутливість цих параметрів до змін ШКФ: у випадку КФК — крутіший нахил ($5,94 \pm 0,40$), що вказує на тіснішу залежність, тоді як для ГП нахил становив $0,58 \pm 0,07$, що відображає більш м'який, але стабільний зв'язок із нирковою функцією.

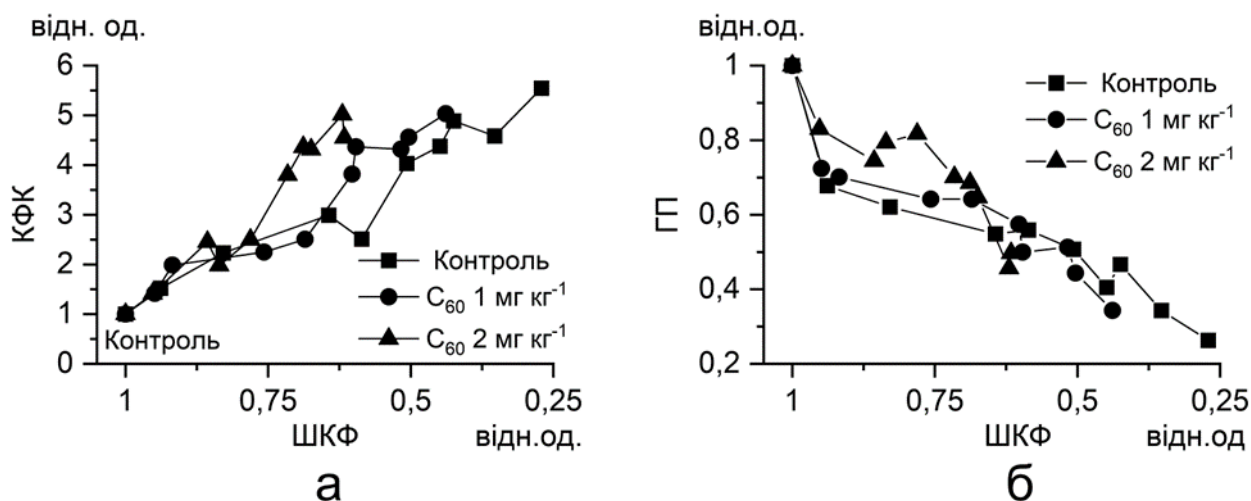


Рис.3.14. Залежності між змінами у вмісті креатинфосфокінази (КФК; а) та активністю глутатіонпероксидази (ГП; б) упродовж 3, 6 та 9 діб експерименту

від ШКФ у контролі (квадрати) та після введення водного розчину C_{60} у дозах 1 мг·кг⁻¹ (кружки) та 2 мг·кг⁻¹ (трикутники)

У межах дослідження було також проаналізовано, яким чином водорозчинна форма C_{60} фулерену впливає на взаємозв'язок між швидкістю клубочкової фільтрації (ШКФ), рівнем креатинфосфокінази (КФК) та активністю глутатіонпероксидази (ГП). Об'єднані результати, отримані на 3, 6 та 9 добу до (контрольна група) і після введення C_{60} у дозах 1 та 2 мг/кг, представлені на рисунку 3.14.

Як видно з графічного матеріалу, водний розчин C_{60} не змінював характер кореляційної залежності між ШКФ і КФК або ШКФ і ГП — відповідні точки на графіках практично збігаються. Водночас було зафіксовано істотне зменшення максимальних відхилень цих показників від контрольних значень, що супроводжувалося підвищенням рівня ШКФ. Це свідчить про позитивний вплив C_{60} на фонові патологічні зміни.

На нашу думку, захисна дія фулерену C_{60} при ниркових ушкодженнях, індукованих рабдоміолізом, реалізується за рахунок його виражених антиоксидантних властивостей. Одна молекула C_{60} здатна зв'язувати до 34 метильних радикалів, а також ефективно нейтралізувати супероксидні аніони та гідроксильні радикали, запобігаючи оксидативному ушкодженню клітинних мембран.

Таким чином, за рахунок інактивації активних форм кисню, що утворюються внаслідок клітинної деструкції при рабдоміолізі, водорозчинні фулерени C_{60} сприяють збереженню цілісності нефронів і зменшують тяжкість проявів гострої ниркової недостатності.

3.4. Гістологічний аналіз тканини нирок та м'язів при гліцериновій моделі ГНН

У контрольних щурів жодних гістопатологічних особливостей у нирці не спостерігається (табл. 3.1; рис. 3.15., А). У щурів, які отримували гліцерин у дозі 5 або 10 мг/кг, спостерігається слабке потовщення капсули Боумена та помірна ретракція клубочкового клубочка, внаслідок чого площа поперечного перерізу ниркових клубочків зменшується на 36-39%. Також спостерігається помірний канальцевого та інтерстиціального некрозу (більш інтенсивний у кірковій нирки). Крім того, спостерігається слабке запалення та помірний крововилив (табл. 3.1; рис. 3.15, В і Г).

У щурів, які отримували гліцерин у дозі 5 мг/кг або 10 мг/кг та C60FAS (2 мг/кг), гістопатологічні ознаки були подібними, але меншої інтенсивності. Ретракція клубочкового апарату спостерігається в меншій кількості ниркових клубочків. Площа поперечного перерізу ниркових клубочків зменшується порівняно з контрольною групою на 25-30%, а також є більшою на 15-17% порівняно з групою щурів, які не отримували C60FAS. Ступінь некрозу в ниркових канальцях та сполучній тканині також нижчий (табл. 3.1; рис. 3.15, С та Е).

У щурів, які отримували гліцерин у дозі 15 мг/кг, ступінь гістопатологічних змін зростає порівняно з щурами, які отримували гліцерин у меншій дозі. Спостерігається сильний некроз ниркових канальців і помірний некроз у сполучній тканині нирки. Також спостерігаються запалення, крововиливи, потовщення капсули Боумена і ретракція клубочкового клубочка середньої інтенсивності та зменшення площі поперечного перерізу ниркових клубочків. Крім того, порушується канальцева структура частини ниркових канальців у мозковій зоні. Діаметр ниркових канальців зменшується на 8% (табл.3.1;рис. 3.15, F).

У щурів, які отримували гліцерин у дозі 15 мг/кг та C₆₀ (2 мг/кг), ступінь гістопатологічних змін менший. Тубулярний некроз середньої інтенсивності, ретракція клубочкового клубочка слабка, площа поперечного перерізу ниркових

клубочків менше зменшена, тубулярна структура ниркових каналців не порушена, діаметр ниркових трубочок не зменшений (табл.; рис. 3.15, Г).

На нашу думку, описані вище позитивні ефекти впливу фулеренів C₆₀ на ХНН, спричинену рабдоміолізом, пов'язані саме з їх потужними антиоксидантними властивостями [15, 16, 22]: одна молекула C₆₀ одночасно захоплює 34 метильні радикали, ефективно інактивує супероксиданіон-радикал і гідроксильні радикали, захищаючи клітинні мембрани від окислення. Зменшуючи кількість вільних радикалів, що утворюються в процесах руйнування рабдоміолізу, водорозчинні C₆₀ фулерени зменшують кількість пошкоджених мембран нефронів і, таким чином, знижують тяжкість ХНН.

У щурів, які отримували гліцерин у дозі 15 мг/кг і C₆₀FAS (2 мг/кг), ступінь гістопатологічних змін нижчий. Тубулярний некроз середньої інтенсивності, втягнення клубочкового пучка слабка, площа поперечного перерізу ниркових клубочків менш редукована, трубчастої структури ниркових каналців немає порушується і не зменшується діаметр ниркових трубок (рис. 3.15, Г).

Таблиця 3.1.

Патогістологічні зміни у нирках щурів за різних умов експозиції фулерену C₆₀ та рабдоміолізу

Групи	Потовщення Боуменової капсули	Зрошення (ретракція) ниркових клубочків	Гломерулярний фіброз	Запалення	Тубулярний некроз	Інтерстиціальний некроз	Крововиливи (геморагії)	Втрата тубулярної структури ниркових трубочок
Контроль	—	—	—	—	—	—	—	—
Фулерен (5 мг/кг)	+	+	+	±	+	+	+	±
Фулерен (5 мг/кг) + C ₆₀ (1 мг/кг)	+	+	++	+	++	++	++	+
Фулерен (10 мг/кг)	±	±	+	±	±	+	±	±
Фулерен (10 мг/кг) + C ₆₀ (1 мг/кг)	+	+	++	+	++	++	++	+
Фулерен (15 мг/кг)	±	±	±	±	±	±	±	±
Фулерен (15 мг/кг) + C ₆₀ (1 мг/кг)	+	+	++	+	++	++	++	+

Примітка: інтенсивність ураження: — — відсутня; ± — слабка; + — середня; ++ — сильна.

На нашу думку, вищеописаний позитив вплив впливу фулеренів C_{60} на ОПН викликані рабдоміолізом, пов'язані саме з їх потужні антиоксидантні властивості так як одна молекула C_{60} одночасно захоплює 34 метильних радикалів, ефективно інактивує супероксиданіон-радикал і гідроксильні радикали, захищаючи клітинні мембрани від окислення.

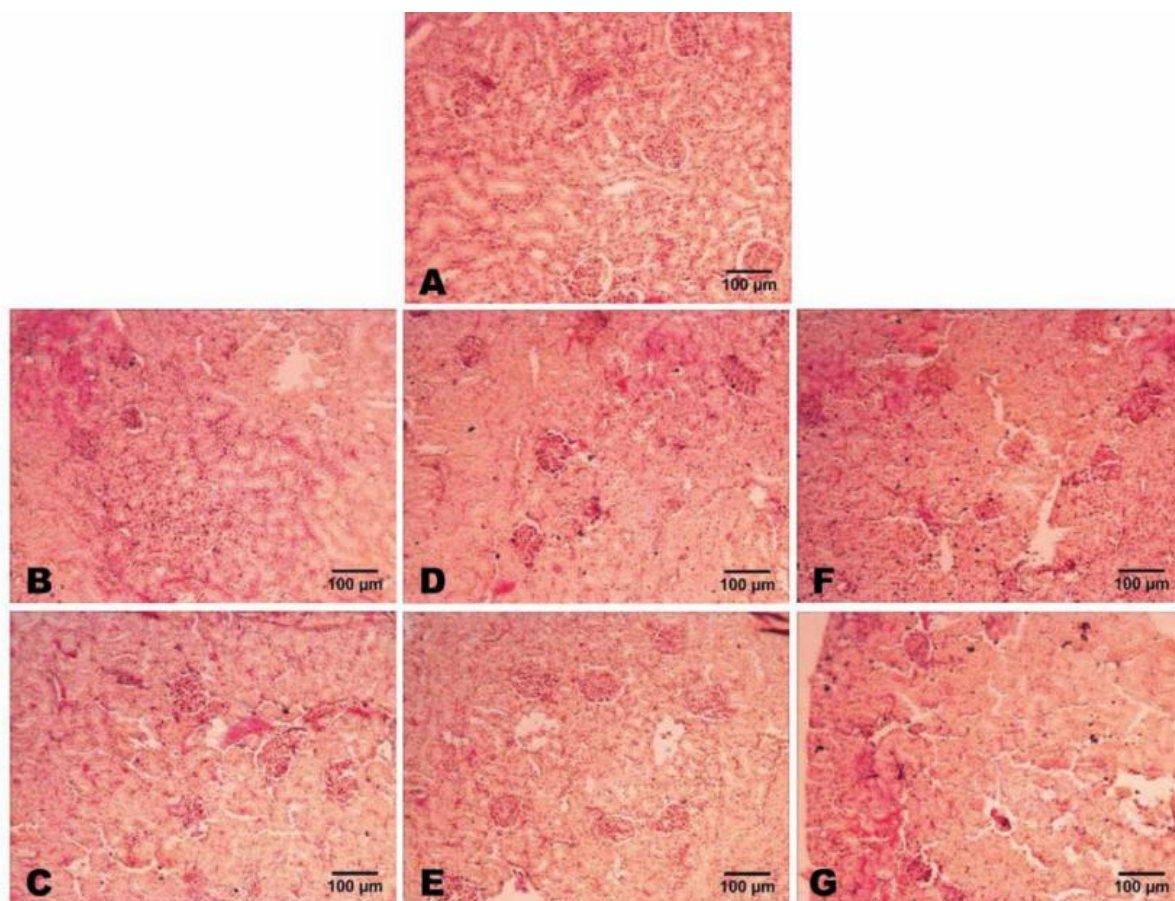


Рис. 3.15. Репрезентативні гістологічні зображення нирки: А – контрольна група; Б – гліцерин (5 мг/кг); С – гліцерин (5 мг/кг) + C_{60} FAS (2 мг/кг); D – гліцерин (10 мг/кг); E – гліцерин (10 мг/кг) + C_{60} FAS (2 мг/кг). кг); F – гліцерин (15 мг/кг); G – гліцерин (15 мг/кг) + C_{60} FAS (2 мг/кг). Фарбування Н&Е. Масштабна шкала – 100 мкм

3.5. Вплив ін'єкцій C₆₀ фулеренів на розвиток рабдоміолізу, викликаного м'язовою травмою закритого типу і пов'язаною з нею гострою нирковою недостатністю.

Причини важкого рабдоміолізу включають пошкодження та розриви м'язових тканин, некроз, тривалу іммобілізацію та тяжкі інфекції. В умовах бойових дій ГНН, індукована рабдоміолізом, є одним з головних факторів важких ускладнень при клінічних реабілітаційних процедурах. Виявлено тісний зв'язок між смертністю, рівнями розвитку рабдоміолізу та ГНН у поранених у бойових діях Іраку та Афганістані, що дозволяє припустити, що вплив рабдоміолізу на смертність може бути опосередковано саме ГНН.

Показано, що ГНН дуже часто зустрічається у поранених у бойових діях, у дослідженнях у відділеннях інтенсивної терапії показано, що вона спостерігається у 34,3% випадків ушкодження м'язової тканини та суттєво підвищує рівень смертності. Однак, навіть після вдалого клінічного лікування рабдоміолізного ушкодження, показано значне збільшення ризику розвитку ГНН після бойової травми та збільшення смертності серед ветеранів бойових дій, які отримали поранення. Показано, що ГНН у пацієнтів з тяжкими травмами трапляється у 50% випадків, що пов'язане з підвищенням рівня їх смертності [64].

3.5.1. Біомеханіка м'язового скорочення при рабдоміолізі, викликаному м'язовою травмою закритого типу і пов'язаною з нею гострою нирковою недостатністю.

На малюнку 3.17 представлені криві генерації сили скорочення *musculus soleus* після ініціації травматичного ушкодження 1,2 та 3 ступеня тяжкості на 1,3,6 та 9 день після ініціації м'язової травми. У перший день після травми інтегрована потужність знизилася до $69\pm3\%$, $43\pm2\%$ та $24\pm1\%$ від контрольних значень при 1,2 та 3 ступеня травми відповідно. На третю добу ці показники склали $29\pm1\%$, $17\pm1\%$ та $11\pm0,5\%$ відповідно, що підтверджує дані про максимальну дисфункцію пошкодженого м'яза саме на 3 добу після травми.

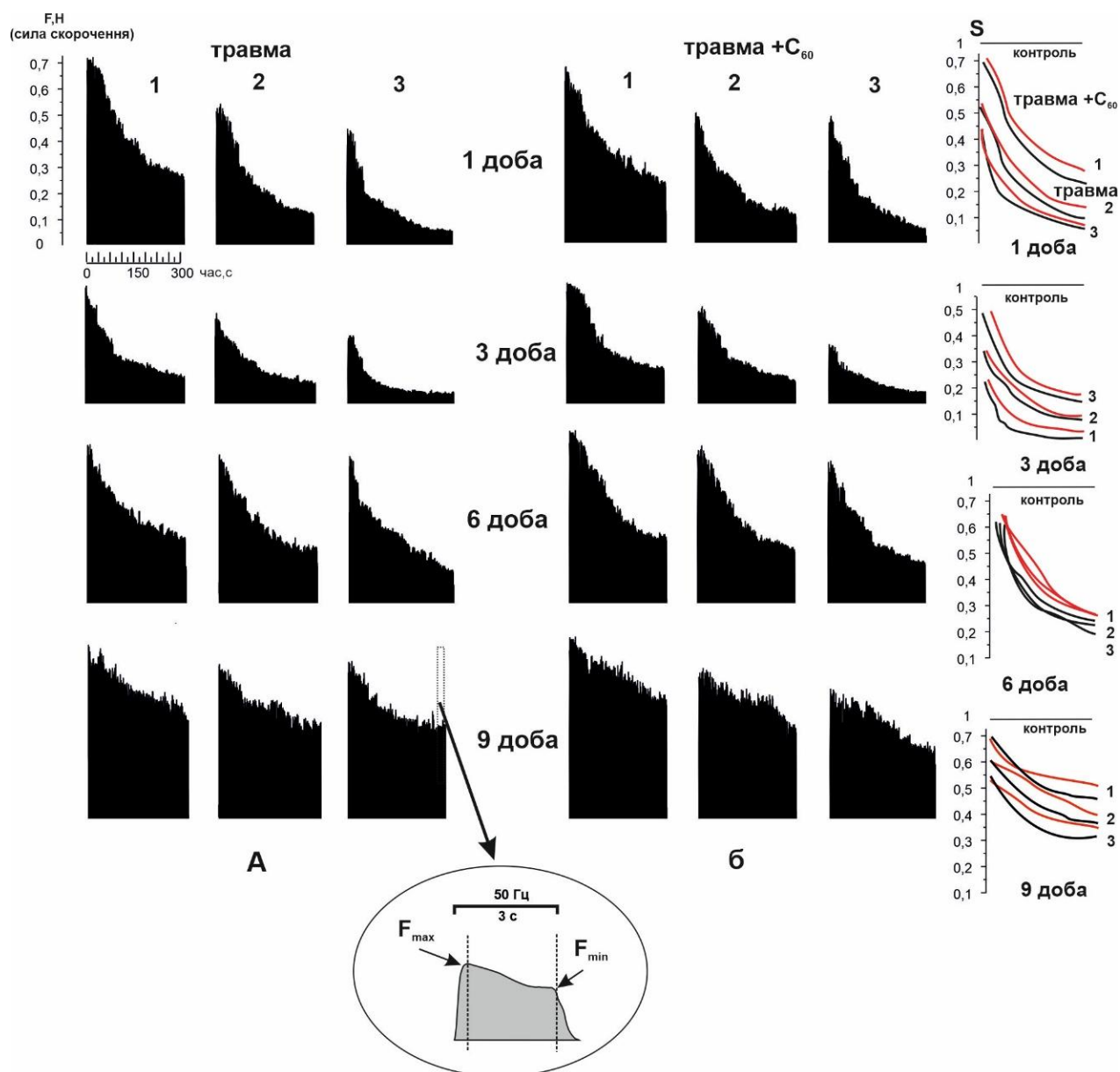


Рис 3.17. Скорочення *musculus soleus* після ініціації травматичного ушкодження.

injury, injury+ C_{60} - сила скорочення травмованої *musculus soleus* і травмою на тлі ін'єкцій C_{60} фулерену при стимуляції сигналом частою 50 Гц тривалістю 3 секунди протягом 300 секунд; 1,2,3 - 1,2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; F_{max} , F_{min} - максимальна та мінімальна сила скорочення поодинокій силовій відповіді м'яза; S - інтегрована потужність м'язового скорочення; 1,3,6,9 day - 1,3,6 та 9 доба після ініціації м'язової травми.

Для більш детального аналізу м'язової дисфункції було проаналізовано зміну рівнів генерації максимальної та мінімальної сили скорочення (рис.3.18).

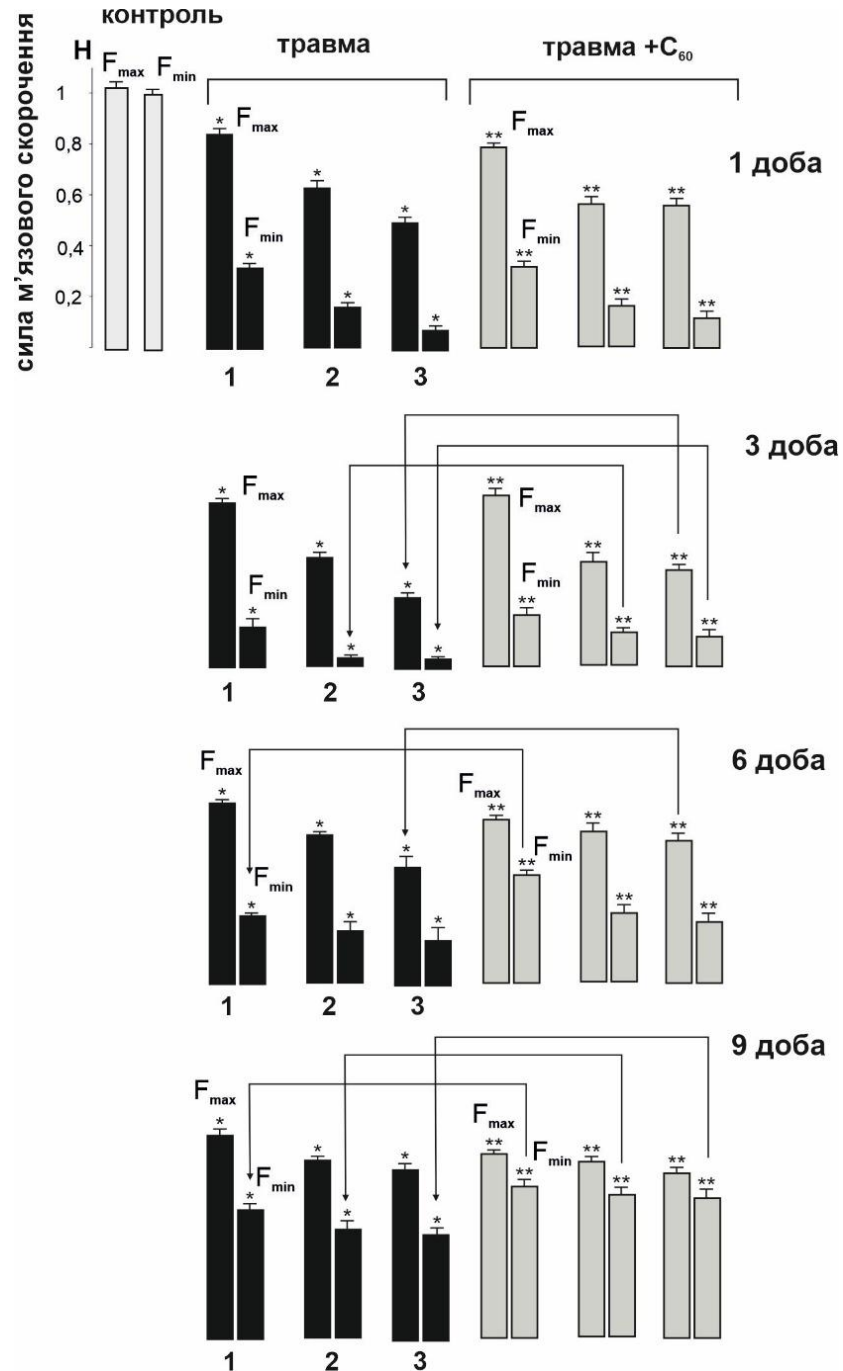


Рис.3.18. Біомеханічні параметри скорочення musculus soleus після ініціації травматичного ушкодження.

injury, injury+C₆₀ - параметри скорочення травмованої musculus soleus і травмою на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1,2,3 - 1,2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; F_{max}, F_{min} – максимальна та мінімальна сила скорочення поодинокій силовій відповіді м'яза; 1,3,6,9 day – 1,3,6 та 9 добу після ініціації м'язової травми.

* p < 0.05; **p<0.05 щодо групи injury.

При виконанні односуглобових рухів дані маркери є основними показниками рівня м'язової дисфункції, аналіз яких дає можливість встановити наявність причинно-наслідкових зв'язків між рівнем зниження біомеханічної активності м'язів і рівнем розвитку патологічного процесу [163]. Позитивний ефект ін'єкцій фулерену на рівень мінімальної сили – найбільш чутливого маркера м'язової дисфункції, на 1 добу після ініціації травми становив $8\pm1\%$, $9\pm1\%$ та $7\pm1\%$. На 3-тю добу (день найбільш максимальних дисфункцій пошкодженого м'яза) ці показники суттєво збільшилися і склали $29\pm2\%$, $73\pm3\%$, та $75\pm4\%$, що на нашу думку пов'язано з антиоксидантними властивостями фулерену, інактивацією їм вільнорадикальних реакцій та зменшення запального процесу.

На 6-у та 9-у добу дані показники склали 45-50%. Зміна рівня максимальної сили при ін'єкціях фулерену склала 12-16% на всіх часових періодах експерименту. Це може бути підтвердженням про купуючу дію фулерену C_{60} саме на вільнорадикальні процеси пошкодження клітинних мембран, збільшуючи можливість міоцитів виробляти тривалу генерацію сили на вищому рівні (мінімальна сила). Незначний позитивний ефект на миттєвий імпульс силової продуктивності (максимальна сила) може бути пов'язаний з тими вільнорадикальними реакціями, які проходять вже всередині ушкодженого міоциту та перешкоджають актіміозиновим взаємодіям.

Таким чином, біомеханічні дослідження показали, що ін'єкції C_{60} фулерену суттєво знижують рівень розвитку м'язової патології після ініціації травматичного ушкодження, що в свою чергу може впливати на рівні ОПП, ініційовані рабдоміолізом.

3.5.2. Біохімічні дослідження при рабдоміолізі, викликаному м'язовою травмою закритого типу і пов'язаною з нею гострою нирковою недостатністю.

Рівень креатиніну є визнаним маркером м'язових ушкоджень та його показники при госпіталізації пацієнтів із рабдоміолізічним ушкодженням м'язової системи, є якісним показником прогнозування посттравматичного гострого ушкодження нирок (ГНН).

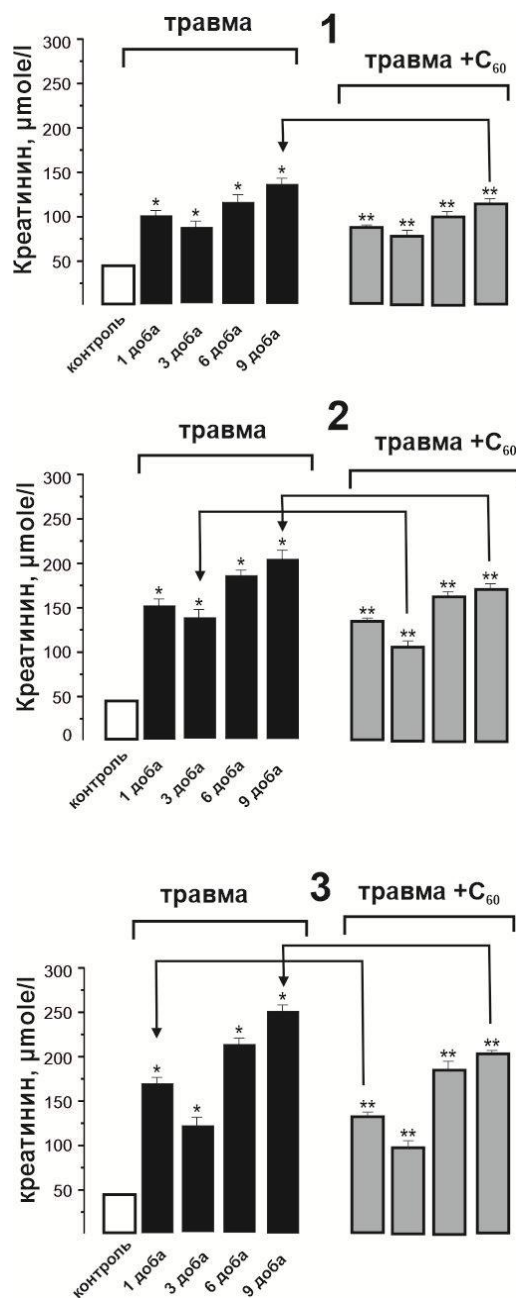


Рис.3.19 Зміна рівня креатиніну при рабдоміолізічному ушкодженні нирок.

injury, injury+C₆₀ - показники після травми musculus soleus та травми на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1,2,3 - 1,2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; 1,3,6,9 day – 1,3,6 та 9 добу після ініціації м'язової травми; * p < 0.05; **p<0.05 щодо групи injury.

Рівень креатиніну в крові при рабдоміолітичній нирковій недостатності може підвищуватись у 2 рази (при 1 стадії), у 3 рази (при 2 стадії), у 4 та вище (при 3 стадії) від вихідного рівня.

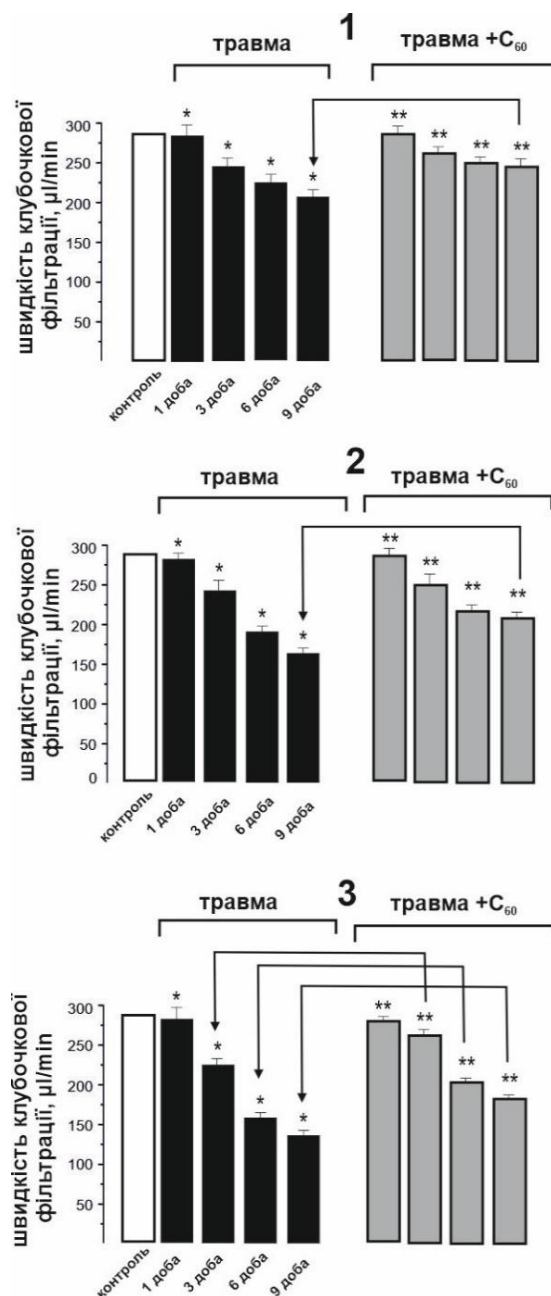


Рис.3.20 Швидкість клубочкової фільтрації при рабдоміолітному ушкодженні нирок.

injury, injury+C₆₀ - показники після травми musculus soleus та травми на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1,2,3 - 1,2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; 1,3,6,9 day – 1,3,6 та 9 добу після ініціації м'язової травми; * p < 0.05; **p < 0.05 щодо групи injury.

Отримані дані (рис.3.19) підтверджують суттєве підвищення рівня креатиніну із підвищенням ступеня м'язового ушкодження.

Однак до 3-ї доби експерименту рівень креатиніну суттєво знизився порівняно з 1-м днем після травми на $11\pm 1\%$, $14\pm 1\%$ та $23\pm 1\%$, що на нашу думку, пов'язане із припиненням вивільнення внутрішньоклітинного вмісту міоцитів у циркулюючу кров. Однак на 6 та 9 добу після травми рівень креатиніну різко підвищувався на 150-170% при 1 ступені та на 300-450% при 3 ступені травми.

Це підвищення визначає розвиток ГНН викликаной рабдоміолізними процесами. Ін'єкції C_{60} фулеренів призвели до зменшення рівня креатиніну на 14-22%, 21-24 та 30-40% при 1, 2 та 3 ступенів травми, що корелювало з рівнями його позитивного впливу на м'язову біомеханіку.

Швидкість клубочкової фільтрації - показник, що найточніше відображає роботу нирок і характеризує їх стан.

Це дуже важливий показник, оскільки за його допомогою можна оцінити здатність нирок виконувати свою основну функцію – очищати плазму та утворювати сечу. При розвитку рабдоміолізної ниркової недостатності поза проксимальним звивистим каналцем, у товстій висхідній частині петлі Генле, сечовий міоглобін з'єднується з білком Тамма-Хорсфалла, утворюючи преципітат. Цей рН-залежний преципітат утворює трубчасті зліпки, що закупорюють дистальні каналці. Вважається, що обструкція збільшує внутрішньоканальцевий тиск вище інтерстиціального, зменшуючи судинний приплив і перфузію, сприяючи запаленню та безпосередньо знижуючи швидкість клубочкової фільтрації за рахунок зміни сил Старлінга, а вплив антиоксидантів на цей процес може знизити рівень розвитку даної патології.

Лінійне зменшення швидкості клубочкової фільтрації зафіксовано починаючи з 3-го дня після травми протягом усього періоду експерименту, що залишився. На 9-ту добу відмінність від контрольних значень склала $21\pm 1\%$, $43\pm 4\%$ та $67\pm 4\%$, при 1, 2 та 3 ступені травми (рис.3.20). При застосуванні фулеренових ін'єкцій ці показники збільшилися приблизно на 17, 21 та 27% при

1, 2 та 3 ступенів травми відповідно. При цьому, слід відзначити мінімальну (3-4%) відмінність швидкості клубочкової фільтрації на 6 та 9 добу експерименту.

Таким чином, основні показники рівня рабдоміолізої ГНН показали позитивні зміни при застосуванні фулеренових ін'єкцій.

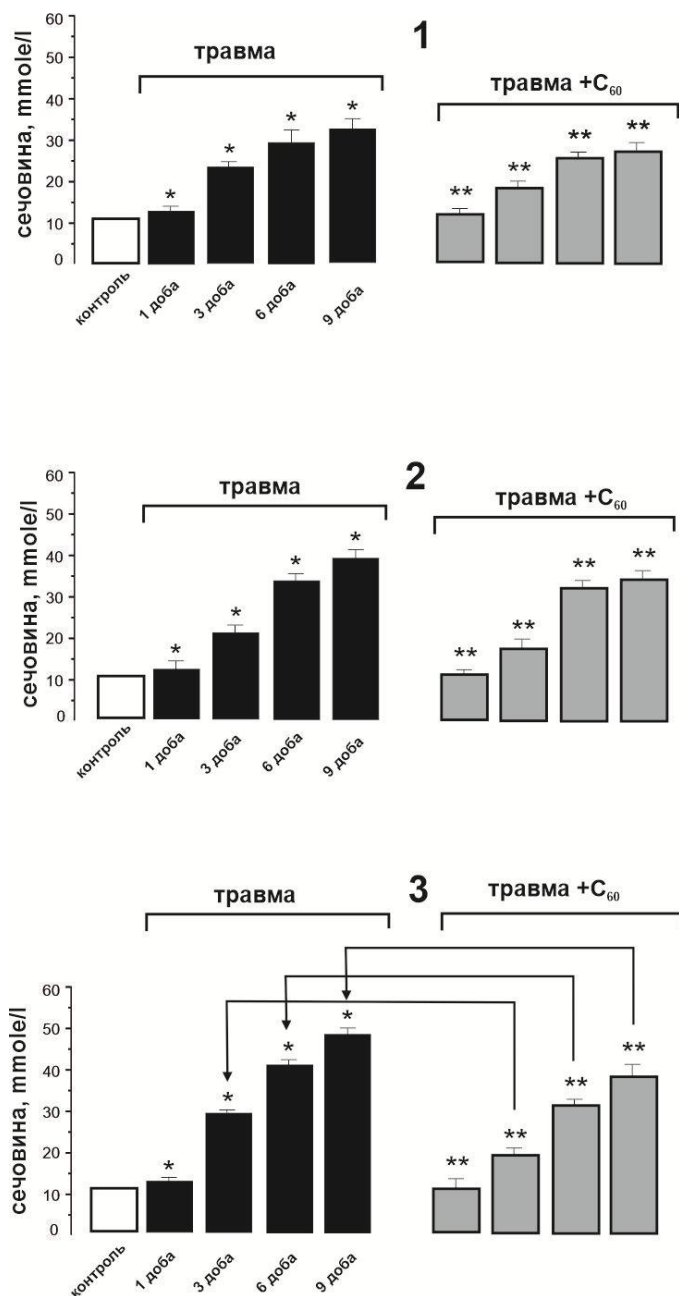


Рис.3.21 Зміна рівня сечовини при рабдоміолізному ушкодженні нирок.

травма, травма +C₆₀ - показники після травми musculus soleus та травми на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1, 2, 3 - 1, 2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; 1, 3, 6, 9 доба – 1, 3, 6 та 9 доба після ініціації м'язової травми; * p < 0.05 щодо контрольної групи; **p < 0.05 щодо групи травма.

У подальших експериментах ми проаналізували якісні показники роботи нирок у разі розвитку рабдоміолітичної ГНН.

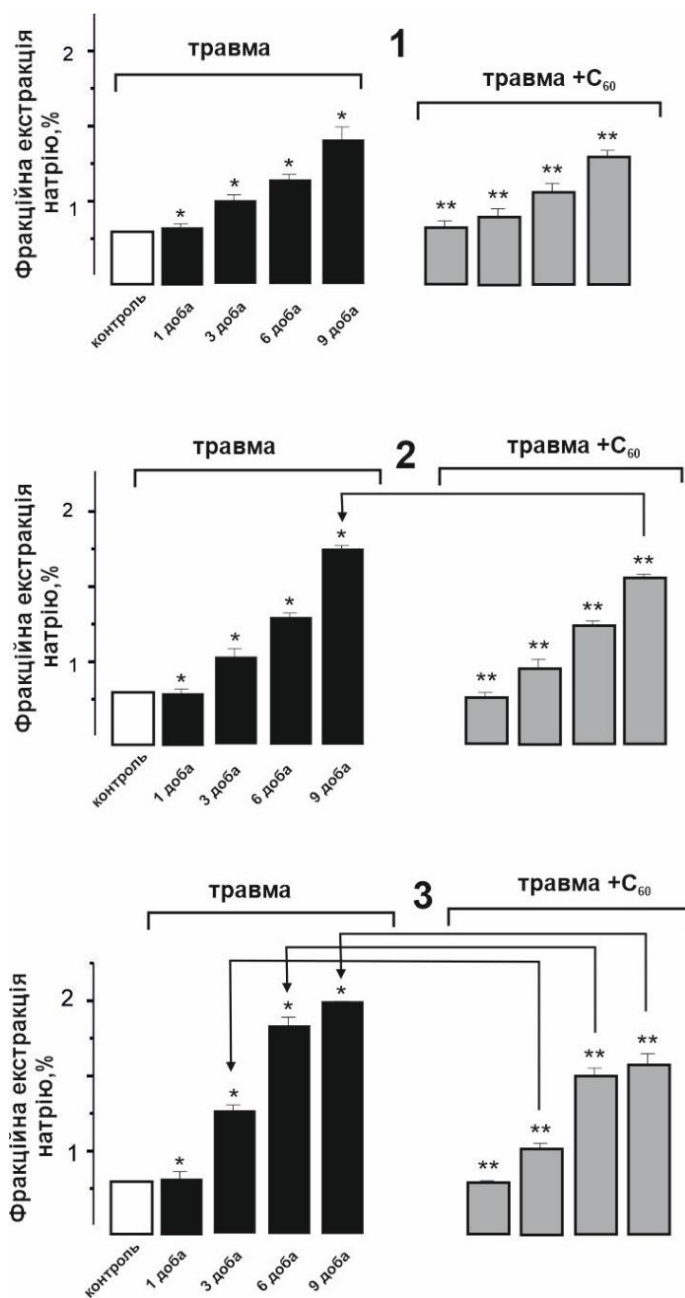


Рис.3.22 Зміна екстракції натрію при рабдоміолітичному ушкодженні нирок. травма, травма +C₆₀ - показники після травми musculus soleus та травми на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1, 2, 3 - 1, 2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; 1, 3, 6, 9 доба – 1, 3, 6 та 9 доба після ініціації м'язової травми; * p <0.05 щодо контрольної групи; **p<0.05 щодо групи травма.

При розвитку ниркової недостатності концентрація в крові азотистих шлаків, які можуть виводитися організмом тільки із сечею, значно зростає, що є ознакою погіршення роботи нирок. Сечовина – один із кінцевих продуктів білкового метаболізму, що містить азот. Результат тесту на сечовину в крові є одним із основних показників якості клубочкової фільтрації при розвитку ниркової недостатності.

Лінійне збільшення рівня сечовини спостерігалось починаючи з 3-ї доби експерименту і склало 83-156% від норми за 1 ступеня травми, 89-211% за 2 ступеня та 203-340% за 3 ступеня, на 3-9 добу експерименту відповідно. Ін'єкції фулерена зменшили концентрацію сечовини на 17-18%, 20-22% та 24-27% при 1,2 та 3 ступеня травми відповідно (рис.3.21).

Також одним із важливих якісних показників ступеня розвитку ГНН є оцінка транспорту натрію, оскільки механізм вільнорадикального гальмування реабсорбції при розвитку рабдоміолізу пов'язаний з пригніченням натрій-калієвої АТФ-азної транспортної системи, а дія антиоксидантів здатна зменшити розвиток каскадних патологічних реакцій. На 3 добу експерименту величина FE_{Na} збільшилася на $31 \pm 1\%$, $98 \pm 3\%$ і $141 \pm 1\%$, при 1-му ступені травми, 2-й та 3-й ступінь підвищило ці показники на 45-271% і 128-387 %, (рис. 3.23) що корелювало із змінами швидкості клубочкової фільтрації.

Ін'єкції фулерена лінійно зменшили рівень даного показника на 13-15% при 1-му ступені травми, 20-23% при 2-му та 25-32% при 3 ступені м'язової травми. Таким чином, застосування фулерена C_{60} як можливої антиоксидантної терапії показало суттєві (15-35%) позитивні ефекти як на основні маркери ниркової недостатності, так і на якісні показники роботи нирок при розвитку рабдоміолізу ГНН. Найбільш суттєві зменшення показників ГНН спостерігається при важких формах рабдоміолізу на 9 добу після травми.

Останнім часом клінічним тестом на визначення рівня рабдоміолізу стали використовувати рівень креатинкінази (СРК), який завдяки швидкості та дешевизні його застосування у багатьох випадках стає стандартним біомаркером для діагностики та оцінки ступеня тяжкості пошкоджень скелетних м'язів при

пораненнях військовослужбовців. Також показано взаємозв'язок підвищення креатинкінази та гострого пошкодження нирок у пацієнтів з м'язовими травмами.

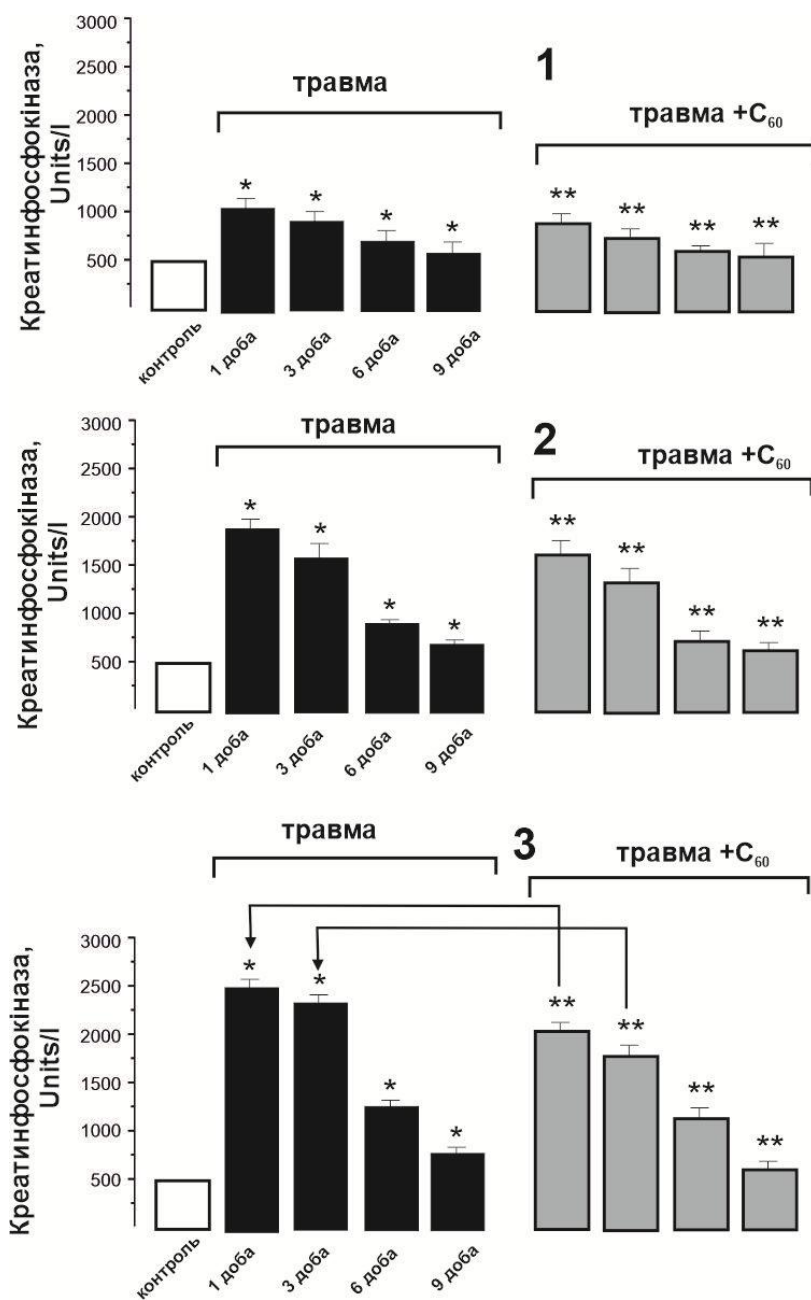


Рис.3.23 Зміна рівня креатинфосфокінази при рабдоміолізованому ушкодженні нирок.

травма, травма +C₆₀ - показники після травми musculus soleus та травми на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1, 2, 3 - 1, 2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; 1, 3, 6, 9 доба – 1, 3, 6 та 9 доба після ініціації м'язової травми; * p <0.05 щодо контрольної групи; **p<0.05 щодо групи травма.

СРК - фермент із системи енергетичного забезпечення скелетно-м'язових клітин, що каталізує перенесення фосфатної групи з АТФ на молекулу креатину з утворенням високоенергетичної сполуки креатинфосфату. При механічному пошкодженні м'язів спостерігається вихід ферменту з клітин та, відповідно, підвищення активності СРК у крові.

Рівень СРК на першу добу після травми піднявся на $112\pm3\%$, $234\pm7\%$ та $414\pm1\%$ порівняно з контрольними значеннями (рис.3.23) при 1,2 та 3 ступені м'язової травми відповідно. На 3,6 та 9 добу експерименту рівень СРК лінійно знижувався і до 9-го дня становив 13-25% від контрольних значень, незважаючи на збільшення рівня ГНН на 6 та 9 добу. Таким чином, у даному випадку підвищення СРК корелювало тільки зі ступенем м'язового пошкодження.

Ін'єкції фулерена суттєво знижували рівень СРК на 1-шу та 3-тю добу після травми. Позитивні ефекти склали $24\pm1\%$, $31\pm1\%$ та $34\pm2\%$ на перший день і $17\pm1\%$, $36\pm2\%$ та $42\pm2\%$ на третій для відповідного ступеня тяжкості травми. На 9-ту добу позитивні ефекти становили трохи більше 5%, що з невеликим рівнем підвищення СРК щодо контролю.

Патологічні запальні процеси, що виникають відразу після травми, є джерелом АФК та сприяють інтенсифікації процесів перекисного окиснення ліпідів. В ході фізіологічного відновлення м'язової тканини кисень, що надходить у тканини, ініціює процес окислення ксантину та гіпоксантину ксантиноксидазою, що призводить до утворення великої кількості супероксид аніон-радикалу та пероксиду водню.

Крім того, при запальних процесах зростає експресія адгезивних молекул на ендотелії. Залучені в осередок ушкодження активовані нейтрофіли також вивільняють перекис водню та провокують каскадні патологічні вільнорадикальні процеси.

Протягом усього експерименту зафіксовано підвищення рівнів H_2O_2 , яке корелювало зі ступенем м'язової травми. Збільшення концентрації H_2O_2 на 1 і 3 день, яке, на нашу думку, пов'язане з руйнуванням м'язових волокон та

подальшими запальними процесами, склало 24-28%, 42-79% та 98-124% при 1, 2 та 3 ступеня травми відповідно (3.24).

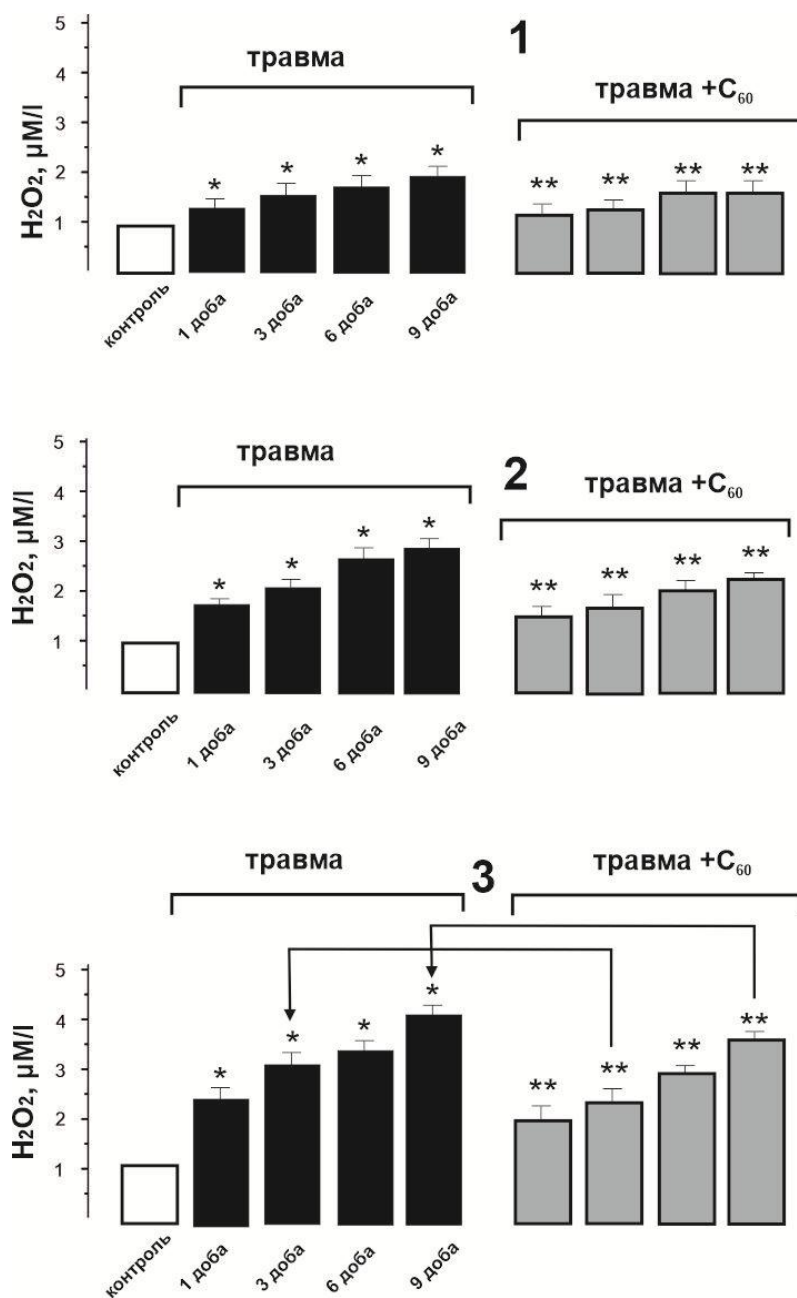


Рис.3.24 Зміна рівня перекису водню при рабдоміолітичному ушкодженні нирок.

травма, травма + C₆₀ - показники після травми musculus soleus та травми на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1, 2, 3 - 1, 2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; 1, 3, 6, 9 доба – 1, 3, 6 та 9 доба після ініціації м'язової травми; * p < 0.05 щодо контрольної групи; **p < 0.05 щодо групи травма.

Подальше збільшення концентрації H_2O_2 ще на $15\pm 1\%$, $26\pm 2\%$ та $33\pm 2\%$ (6-й день) та на $15\pm 1\%$, $26\pm 2\%$ та $33\pm 2\%$ (9-ту добу експерименту) показує розвиток рабдоміолізої ГНН.

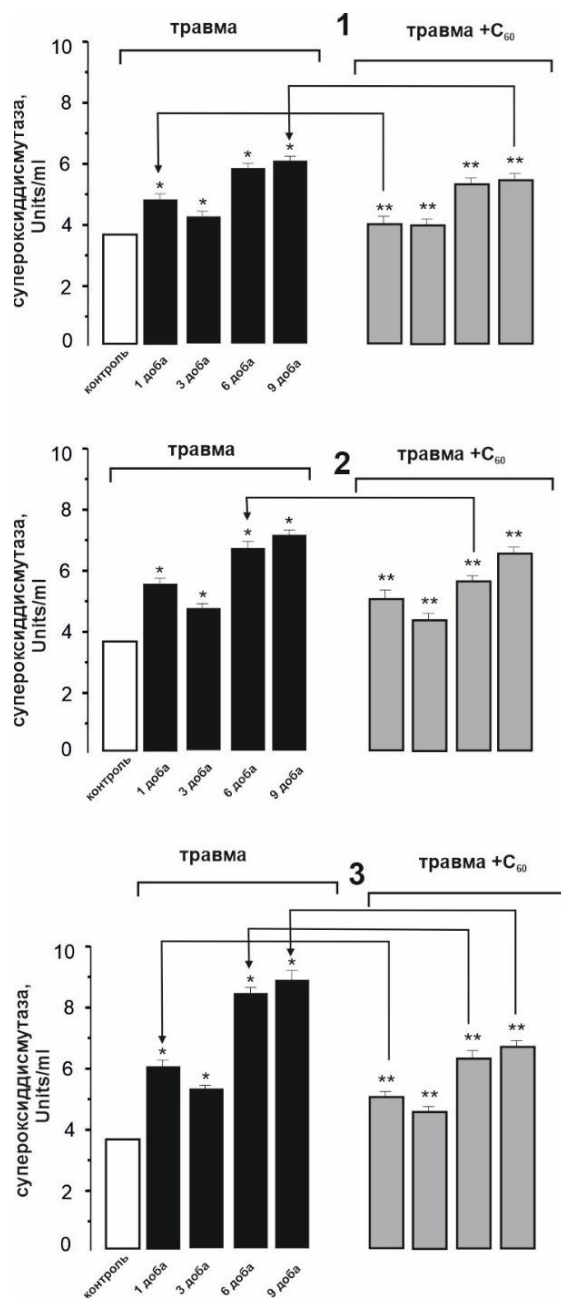


Рис.3.25 Зміна рівня супероксиддисмутази при рабдоміолізному ушкодженні нирок.

травма, травма +C₆₀ - показники після травми musculus soleus та травми на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1, 2, 3 - 1, 2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; 1, 3, 6, 9 доба – 1, 3, 6 та 9 доба після ініціації м'язової травми; * p <0.05 щодо контрольної групи; **p<0.05 щодо групи травма.

Лінійне зменшення концентрації H_2O_2 при фулеренових ін'єкціях (рис.3.24) на 11-12% (1-й ступінь), 15-18% (2-й ступінь) та 22-29% (3-й ступінь) пов'язано, на нашу думку з антиоксидантними властивостями застосування препарату, здатного зменшувати рівень посттравматичних вільнорадикальних реакцій [19-20].

Збільшення рівня H_2O_2 при травмуванні м'язових волокон призводить до зростання активності ферменту каталази (CAT), який виконує захисну антиоксидантну функцію, каталізуючи розкладання пероксиду водню на воду та кисень та супероксиддисмутази (SOD).

Тому в механізмах регуляції вільно-радикальних та пероксидних процесів при м'язових ушкодженнях ключову роль відіграють ферменти антиоксидантного захисту, такі як SOD та CAT.

Найпотужнішим природним антиоксидантом і ферментом першої ланки антиоксидантного захисту є SOD, що здійснює реакцію дисмутації супероксидних аніон-радикалів і перетворює їх на менш реакційно здатні молекули пероксиду водню. Рівень SOD на 1-шу добу експерименту збільшився на $25 \pm 1\%$, $39 \pm 4\%$ та $45 \pm 2\%$, при 1, 2 та 3 ступеня травми відповідно. На 3 добу експерименту рівень SOD знизився на 11-14%, що, мабуть, пов'язане із зменшенням запальних процесів у м'язовій тканині. Однак, на 6 і 9 добу її рівень суттєво збільшився на 23-29% (1-й ступінь) 39-41% (2-й ступінь та 56-59% (3-й ступінь) порівняно з 3-м днем експерименту, що швидше за все, пов'язано з розвитком ГНН, індукованої рабдоміолізними процесами.

Ін'єкції фулерена зменшили рівень SOD на 12-15% на 1 та 3 добу експерименту відповідно. На 6-ту та 9-ту добу позитивний вплив фулеренових ін'єкцій становив $9 \pm 1\%$ (1 ступінь), $15 \pm 1\%$ (2-й ступінь) і $29 \pm 2\%$ (3-й ступінь) відповідно (рис.3.25).

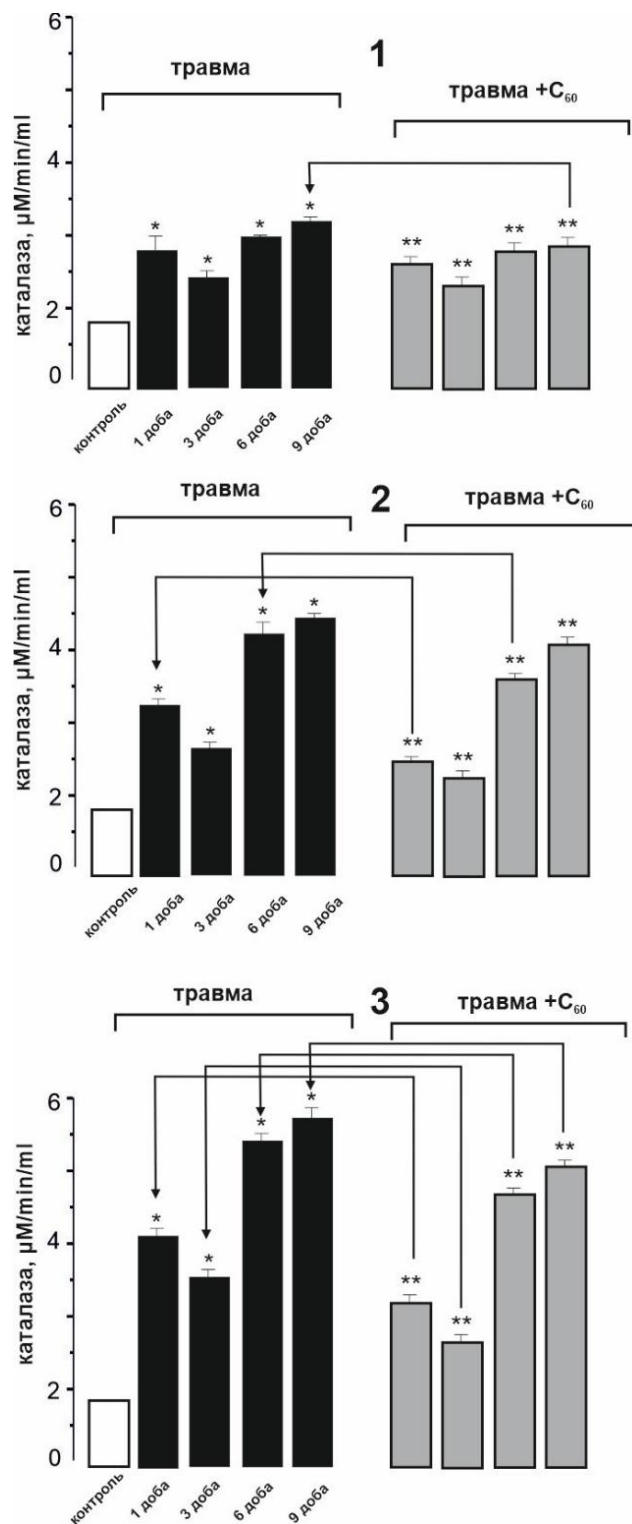


Рис.3.26. Зміна рівня каталази при рабдоміолітичному ушкодженні нирок.

травма, травма + C₆₀ - показники після травми musculus soleus та травми на тлі ін'єкцій C₆₀ фулерену; 1, 2, 3 - 1, 2 та 3 ступінь м'язової травми відповідно; 1, 3, 6, 9 доба – 1, 3, 6 та 9 доба після ініціації м'язової травми; * p < 0.05 щодо контрольної групи; **p < 0.05 щодо групи травма.

Аналіз змін рівнів каталази (CAT) у відсутності істотних відмінностей від аналогічних змін рівня SOD. Позитивний вплив фулеренових ін'єкцій на рівень CAT також знаходився в рамках змін SOD у всіх тимчасових діапазонах, що досліджуються, і ступенів м'язової травми (рис.3.26.).

Патогістологічний аналіз. У щурів із пошкодженням м'язів м'язові волокна руйнуються, а сполучна тканина сильно розростається в місці пошкодження (рис. 3.27 В, D і F). В інших відділах м'яза нормальна гістологічна структура м'язових волокон порушується. Частина волокон гіпохромна, з ознаками набряку. Деякі волокна гіперхроматичні, з ознаками деструкції. Порушується структура міофібрил всередині м'язових волокон. Спостерігається порушення поперечної смугастості волокна. Волокна можуть зменшуватися в діаметрі.

Зростає і сполучна тканина: площа, зайнята сполучною тканиною, збільшується в усіх досліджуваних групах (табл. 3.2). При 1- му та 2 -му ступенях тяжкості ушкодження м'язів (рис. 3.27 Б і Г) збільшення об'єму сполучної тканини відбувається переважно за рахунок основної речовини матриксу сполучної тканини, а при 3- му ступені (рис. 3.27 F) – переважно за рахунок розростання колагенових волокон. Ступінь вираженості вищезазначених патолого-морфометричних змін неоднакова в різних дослідних групах (табл. 3.1).

Площа, зайнята сполучною тканиною, у щурів з I ступенем тяжкості м'язового ураження на $80-110 \pm 7 \%$ більша, ніж у контрольній групі. У щурів, які не отримували водорозчинні C_{60} фулерени, діаметр м'язових волокон на $16 \pm 2 \%$ менший порівняно з контрольною групою, але не відрізняється від контрольних значень у щурів, які їх отримували (табл. 3.2).

У щурів з 2 -м ступенем тяжкості м'язового ураження, яким вводили водорозчинні фулерени C_{60} , площа сполучної тканини на $20 \pm 2 \%$ менша, а діаметр м'язових волокон на $30 \pm 2 \%$ більший (і не відрізняється від контролю) порівняно з щурами, які їх не отримували (табл. 3.2).

У щурів із III ступенем тяжкості ураження м'язів, яким вводили водорозчинні фулерени C_{60} , площа сполучної тканини на $31 \pm 2 \%$ менша, а діаметр м'язових волокон — на $12 \pm 1 \%$ більший порівняно з щурами, які їх не отримували (табл. 3.2).

Так, у щурів, які отримували водорозчинні фулерени C_{60} , сполучна тканина не розростається, а діаметр м'язових волокон не зменшується (при 1-му і 2-му ступенях ушкодження м'язів) або зменшується в меншій мірі (при 3-му ступені тяжкості ушкодження м'язів). Ступінь деструктивних патологічних змін м'язової тканини також менший (рис. 3.27 С, Е і G).

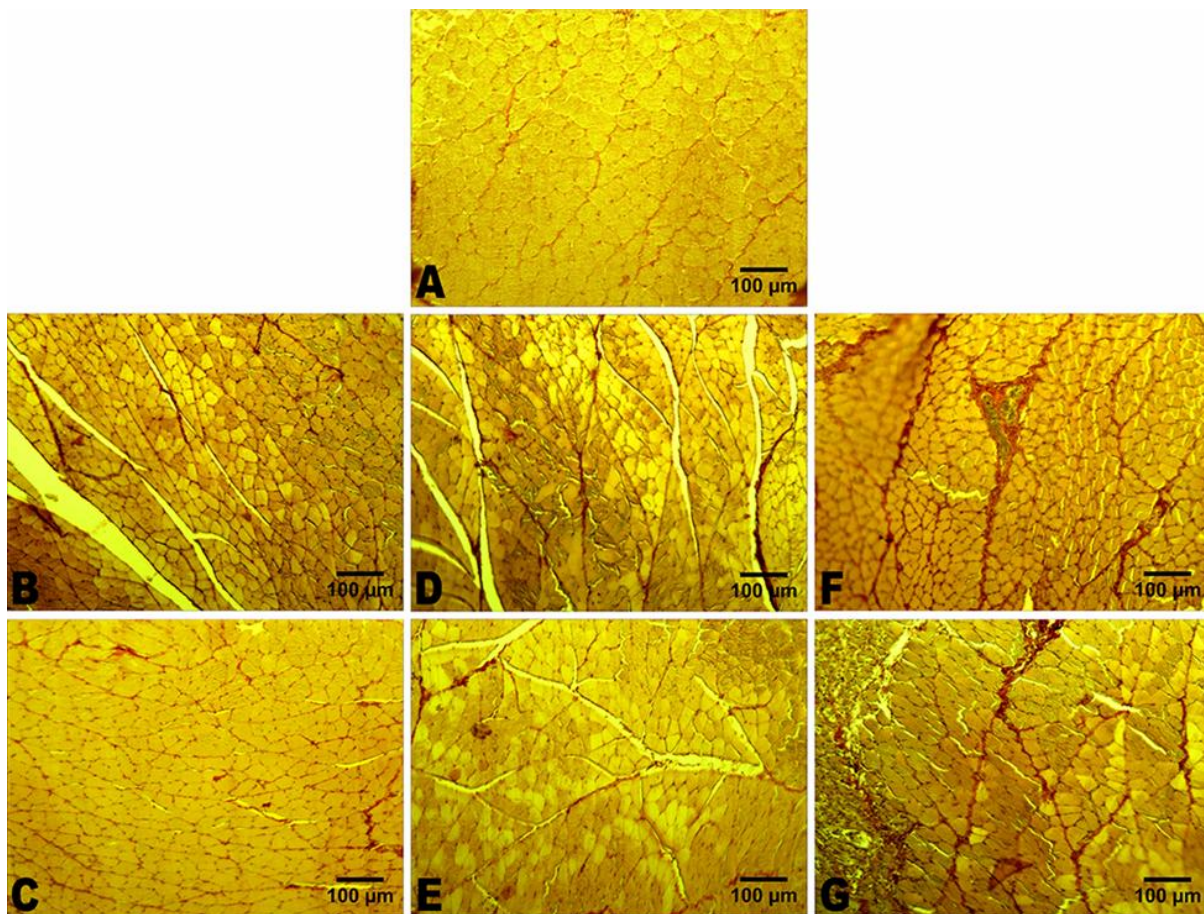


Рисунок 3.27. Репрезентативні гістологічні зображення камбаловидного м'яза: (А) – контрольна група; (Б) – ушкодження м'язів (1 ст.); (С) – ушкодження м'язів (1 ст.) + C_{60} ; (Г) – ушкодження м'язів (2 ст.); (Е) – м'язова травма (2-й ступінь тяжкості) + C_{60} ; (F) – м'язова травма (3 ст.); (G) – м'язова травма (3 ст.)

+ С₆₀ . Фарбування гематоксиліном і пікрофуксином за ван Гізоном. Масштабні шкали – 100 мкм.

У контрольних щурів нирки мають нормальну гістологічну структуру (Рис. 3.28. А). У щурів з м'язовою травмою (Рис. 3.28 В, D і F) спостерігається ретракція гломерулярного клубочка в частині ниркових клубочків. Як наслідок, площа поперечного перерізу ниркових клубочків зменшується. Крім того, у випадках 3-го ступеня тяжкості пошкодження м'язів (Рис. 3.28 F) спостерігається незначний крововилив у деяких ниркових клубочках. Діаметр ниркових трубок може зменшуватися (Таблиця 3.2).

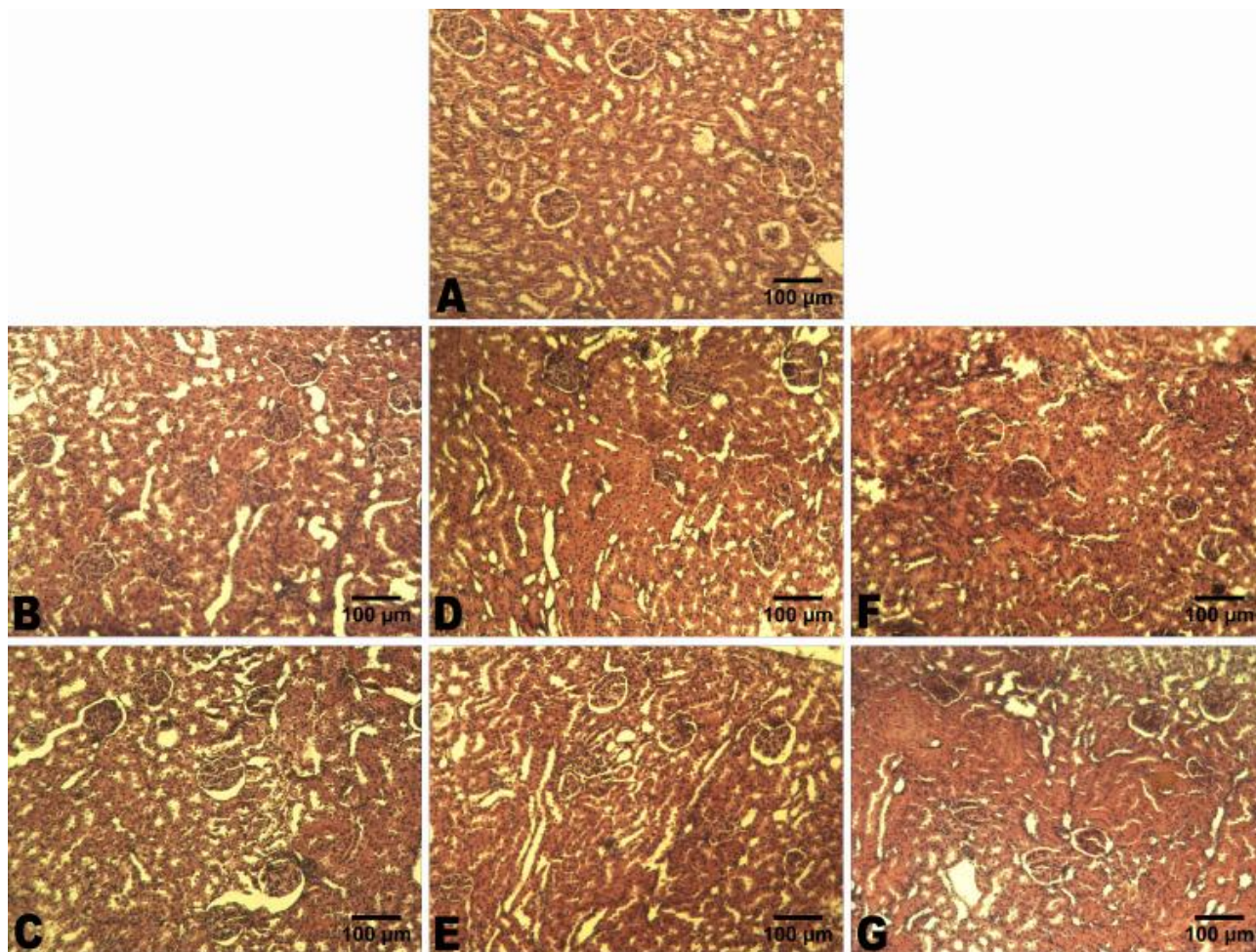


Рис 3.28. Репрезентативні гістологічні зображення нирки: (А) - контрольна група; (В) - травма м'язів (1-й ступінь тяжкості); (С) - травма м'язів (1-й ступінь тяжкості) + С60; (D) - травма м'язів (2-й ступінь тяжкості); (Е) - травма м'язів (2-

й ступінь тяжкості) + С60; (F) - травма м'язів (3-й ступінь тяжкості); (G) - травма м'язів (3-й ступінь тяжкості) + С60. Гістологічне забарвлення. Шкала - 100 мкм.

Таблиця 3.2. Морфометричні особливості нирки щурів після введення гліцерину та C₆₀FAS

Групи морфометричних ознак	Діаметр м'язових волокон, мкм	Площа, зайнята сполучною тканиною, мкм ² /мкм ²	Площа поперечного перерізу ниркових клубочків, мкм ²	Діаметр ниркових трубок, мкм
КОНТРОЛЬ	30,2 ± 1,0	0,10 ± 0,01	4848 ± 217	36,1 ± 1,3
Травма м'язів (1 ступінь тяжкості)	25,4 ± 1,1 *	0,21 ± 0,02 *	2723 ± 149 *	32,2 ± 1,1 *
Травма м'язів (1 ступінь) + C ₆₀	29,5 ± 1,5 ^	0,18 ± 0,01 ^	3681 ± 205 ^	35,0 ± 1,1 ^
Травма м'язів (2 ступінь тяжкості)	21,6 ± 0,4 *	0,25 ± 0,03 *	3853 ± 163 *	32,8 ± 1,0 *
Травма м'язів (2 ступінь) + C ₆₀	28,0 ± 0,9 ^	0,20 ± 0,01 ^	3460 ± 116 ^	34,3 ± 1,0 ^
Травма м'язів (3 ступінь тяжкості)	23,2 ± 0,6 *	0,22 ± 0,02 *	3572 ± 217 *	29,0 ± 1,1 *
Травма м'язів (3 ступінь) + C ₆₀	26,0 ± 1,4 ^	0,15 ± 0,01 ^	3629 ± 228 ^	31,7 ± 1,0 ^

Примітки : * Р < 0,05 порівняно з контрольною групою; ^ Р < 0,05 порівняно з групою пошкодження м'язів при такому ж ступені тяжкості.

Таким чином, помітних гістопатологічних змін у нирках після травми м'язів не спостерігається. Однак морфометричні показники можуть знижуватися (це свідчить про зниження функціональної активності нирки). Вираженість цих змін варіює в різних експериментальних групах. Наприклад, діаметр ниркових каналців у щурів з 3-м ступенем тяжкості м'язової травми, які отримували водорозчинні фулерени C₆₀, більший на $10 \pm 1\%$ порівняно з щурами з травмою (табл. 3.2; рис. 3.28G), які їх не отримували. У щурів з 1-м та 2-м ступенями тяжкості травми м'язів, які отримували водорозчинні фулерени C₆₀, діаметр ниркових каналців не відрізнявся від контрольних значень (табл. 3.2; рис. 3.28 С та Е).

Отже, описані вище позитивні ефекти впливу фулеренів C₆₀ на ГНН, спричинену рабдоміолізом, пов'язані саме з їх потужними антиоксидантними властивостями [25,26]. Молекули C₆₀ ефективно інактивують АФК, захищаючи мембрани нефронів від окиснення, і

Таким чином, у всіх проведених тестах відбувається зміна описаних біомеханічних та біохімічних параметрів приблизно на 27-30% при терапевтичному введенні фулерену C₆₀. Це свідчить про наявність компенсаторної активації фулереном C₆₀ ендогенної антиоксидантної системи в процесі посттравматичних змін *musculus soleus*, викликаних механічним пошкодженням різних ступенів тяжкості. Однак, зниження ін'єкціями фулерену рівня рабдоміолізу не може бути єдиною причиною зменшення рівня ниркової недостатності.

На нашу думку, C₆₀ фулерен може впливати на активність ендогенних антиоксидантів, пригальмовуючи виникнення деструкцій системи виділення, що зменшує рівень гострої ниркової недостатності. Також, можливо припустити про його терапевтичний вплив та на прискорення процес відновлення пошкоджених рабдоміолізом структур.

Отримані результати свідчать, що терапевтичне застосування водорозчинних C₆₀ знижує рівень ЛПНЩ у крові за розвитку НН, спричиненої рабдоміолізічним пошкодженням скелетних м'язів. Враховуючи той факт, що НН

має летальність до 30% і наразі не існує адекватних методів її швидкого подолання, а основою лікування є агресивна підтримуюча терапія, яка призводить до хронічних побічних заварювань, пов'язаних з підвищенням рівня ЛПНЩ, запропонована вперше фулеренова терапія цієї патології відкриває нові перспективи для клінічних досліджень.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Досліджено біомеханічні, біохімічні та морфологічні зміни, що виникають при м'язових травмах *musculus soleus*, викликаних *скрашсиндромом* та ін'єкціями гліцеролу різних ступенів тяжкості з подальшим рабдоміолізом та розвитком гострої ниркової недостатності. Фіксація параметрів відбувалася на 1,3,6 та 9 добу після травми. Як терапевтичний агент використані внутрішньочеревні ін'єкції водорозчинного C_{60} фулерену в концентрації 1 мг/кг.

Описано зміни сили скорочення *musculus soleus*, інтегрованої потужності м'яза, рівня креатеніну, креатенінфосфокінази, швидкості клубочкової фільтрації, вміст ліпопротеїдів низької щільності, рівня сечовини та зміни фракційної екстракції натрію. Проаналізовано зміни рівнів про- та антиоксидантного балансу: SOD, H_2O_2 та CAT.

Показано позитивну зміну всіх досліджуваних біомеханічних та біохімічних маркерів, що підтверджує можливість застосування водного розчину C_{60} фулеренів як терапевтичного агента здатного зменшувати та коригувати патологічні стани м'язової та видільної системи, що виникають при посттравматичному рабдоміолізі скелетних м'язів.

Показано, що введення гліцерину в окремих м'яз дає змогу зменшити кількість використаного гліцерину в 2 рази. Показано, що рівень ниркової недостатності при токсичному гліцериновому рабдоміолізі залежить від часу після ініціації патології. Нові антиоксидантні методи впливу на розвиток ниркової недостатності показали ефективність ін'єкцій водного розчину фулерену, який здатний нейтралізувати шкідливу дію міоглобіну.

Показана чітка тенденція до зменшення описаних біохімічних параметрів приблизно на 20-30 % при використанні ін'єкцій водного розчину C_{60} фулеренів в концентрації 1 мг/кг, та ще на 12-15% при збільшенні його концентрації до 2 мг/кг. Показано, що ін'єкції водного розчину C_{60} у дозі 1 мг/кг знижували вміст ліпопротеїдів низької щільності у крові щурів в середньому на (13-18)%, а

підвищення дози водного розчину C_{60} удвічі (2 мг/кг) сприяла зменшенню рівня ЛПНЩ лише на тяжких стадіях рабдоміолізу.

Показано, що за внутрішньочеревному введенні розчину фулерену C_{60} відбувається збільшення швидкості клубочкової фільтрації яке склало 14,17 та 19% при дозі фулерену 1мг/гк та 29, 38 та 51% при збільшенні дози фулерену до 2мг/кг.

Показано, що ін'єкції фулерену найбільш якісно впливали на збільшення рівня ШКФ при рабдоміолізному ГНН важкого ступеня та при дозі 2мг/кг. Рівень глутатіонпероксидази зменшувався приблизно на 20,43 та 67% при збільшенні ступеня важкості ГНН. Ін'єкції фулерену C_{60} в дозі 1 мг/кг показали позитивний ефект на рівні 18, 27 та 39% відповідно, який збільшувався на 11,17 та 24% при збільшенні концентрації фулерену до 2 мг/кг.

Аналіз отриманих експериментальних даних, зокрема змін у швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), рівнях креатинфосфокінази (КФК) та глутатіонпероксидази (ГП) у крові тварин, свідчить про ефективну антиоксидантну дію екзогенного фулерену C_{60} . Застосування C_{60} дозволяє зменшити негативний вплив активних форм кисню (АФК) на клітинні та субклітинні структури, що беруть участь у розвитку гострої ниркової недостатності (ГНН), спричиненої рабдоміолізом скелетних м'язів, індукованим гліцерином.

Найбільш виражений терапевтичний ефект спостерігався при введенні водного розчину C_{60} у дозі 2 мг/кг, що супроводжувалося значним підвищенням ШКФ саме при тяжкому ступені ураження нирок. Це вказує на перспективність використання C_{60} як засобу для терапії патологій, пов'язаних із надмірною активацією вільнорадикального окислення, зокрема при м'язовій деструкції.

Одержані результати також дозволяють удосконалити загальноприйняту модель гліцерин-індукованого рабдоміолізу. Показано, що внутрішньом'язове введення 50%-го розчину гліцерину у дозі 10 мг/кг є ефективним для ініціації ГНН, однак застосування локального введення гліцерину в окремий м'яз

дозволяє зменшити навантаження на організм, знизивши дозу вдвічі без втрати моделюючого ефекту.

У тварин, яким вводили водний розчин С60 у дозі 2 мг/кг, спостерігалось зменшення розмірів ниркових клубочків, зниження проявів некрозу, а також зменшення активності супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ) у крові, що свідчить про зниження рівня оксидативного стресу.

Крім того, встановлено тісний кореляційний зв'язок між тяжкістю ниркового ураження, підвищенням рівнів креатиніну та сечовини, а також активністю СОД і КАТ у крові. Це підтверджує значущість антиоксидантного компонента в патогенезі рабдоміоліз-індукованої ниркової недостатності та ефективність водорозчинного С60 як потенційного нефропротектора.

ВИСНОВКИ

На основі проведених комплексних експериментальних досліджень, спрямованих на вивчення біомеханічних, біохімічних та функціональних змін при рабдоміолізі й асоційованій гострій нирковій недостатності, встановлено низку важливих закономірностей впливу водного розчину C_{60} фулеренів. Отримані результати дали змогу оцінити ефективність цього наноматеріалу як потенційного терапевтичного агента для корекції патологічних змін у м'язовій і видільній системах, що виникають унаслідок травматичного пошкодження скелетних м'язів.

1. Показано, що використання водного розчину C_{60} фулерену в процесі ініціації рабдоміолізої та гліцеролової НН у дозі 1 мг/кг зменшує значення основних біохімічних маркерів патології на 20-30 % та додатково ще на 12-15 % зі збільшенням його дози вдвічі (2 мг/кг). Упродовж розвитку ниркової дисфункції, спричиненої рабдоміолізом, спостерігали виражену кореляцію між рівнями каталази і супероксиддисмутази плазми крові та біохімічними показниками ураження нирок з коефіцієнтом кореляції 0,94.

2. У всіх проведених тестах відбувається зміна описаних біомеханічних параметрів скорочення травмованого *musculus soleus* приблизно на 27-30% за терапевтичного введення фулерена C_{60} . Це свідчить про наявність компенсаторної активації фулереном C_{60} ендогенної антиоксидантної системи в процесі посттравматичних змін *musculus soleus*, спричинених механічним ушкодженням різних ступенів тяжкості.

3. Аналіз біохімічних параметрів плазми крові, зокрема зміни у про- та антиоксидантній системі та патоморфологічний аналіз, дозволяє зробити висновок, що застосування водорозчинних фулеренів C_{60} ефективно запобігає пошкодженню клітинних і субклітинних структур, викликаному дією активних форм кисню при розвитку гострої ниркової недостатності.

4. На основі отриманих результатів є можливість оптимізувати стандартну експериментальну модель гліцерин-індукованого рабдоміолізу, яка передбачає

внутрішньом'язове введення 50% розчину гліцерину у дозі 10 мг/кг, що дозволить покращити відтворюваність та точність досліджень у сфері нефротоксичності.

5. Виходячи з отриманих даних, можна стверджувати, що позитивна зміна всіх досліджуваних біомеханічних і біохімічних маркерів підтверджує можливість застосування водного розчину C_{60} фулеренів як терапевтичного агента, здатного зменшувати й коригувати патологічні стани м'язової та видільної системи, які виникають у разі травм скелетних м'язів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Candela N, Silva S, Georges B, et al. Short- and long-term renal outcomes following severe rhabdomyolysis: a French multicenter retrospective study of 387 patients. *Ann Intensive Care*. 2020;10:27. doi: 10.1186/s13613-020-0645-1.
2. Kodadek L, Carmichael SP II, Seshadr A, Pathak A, Hoth J, Appelbaum R, et al. Rhabdomyolysis: an American Association for the Surgery of Trauma critical care committee clinical consensus document. *Trauma Surg Acute Care Open*. 2022 Jan 27;7(1):e000836. doi: 10.1136/tsaco-2021-000836. eCollection 2022.
3. Harrois A, Soyer B, Gauss T, Hamada S, Raux M, Duranteau J. Prevalence and risk factors for acute kidney injury among trauma patients: a multicenter cohort study. *Crit Care*. 2018 Dec 18;22(1):344. doi: 10.1186/s13054-018-2265-9.
4. Stewart IJ, Faulk TI, Sosnov JA, Clemens MS, Elterman J, Ross JD, et al. Rhabdomyolysis among critically ill combat casualties: Associations with acute kidney injury and mortality. *J Trauma Acute Care Surg*. 2016 Mar;80(3):492-498.
5. Heegard KD, Stewart IJ, Cap AP, Sosnov JA, Kwan HK, Glass KR, et al. Early acute kidney injury in military casualties. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015 May;78(5):988-93. doi: 10.1097/TA.0000000000000607.
6. Stewart IJ, Sosnov JA, Howard JT, Chung KK. Acute kidney injury in critically injured combat veterans: A retrospective cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2016 Oct;68(4):564-570. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.03.419.
7. Harrois A, Libert N, Duranteau J. Acute kidney injury in trauma patients. *Curr Opin Crit Care*. 2017 Dec;23(6):447-456. doi: 10.1097/MCC.0000000000000463.
8. Eriksson M, Brattström O, Mårtensson J, Larsson E, Oldner A. Acute kidney injury following severe trauma: Risk factors and long-term outcome. *J Trauma*

- Acute Care Surg.* 2015 Sep; 79(3):407-12. doi: 10.1097/TA.0000000000000727.
9. Perkins ZB, Haines RW, Prowle JR. Trauma-associated acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care.* 2019 Dec; 25(6):565-572. doi: 10.1097/MCC.0000000000000655.
 10. Zeng X, Zhang L, Wu T, Fu P. Continuous renal replacement therapy (CRRT) for rhabdomyolysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jun 15; (6). doi: 10.1002/14651858.CD008566.pub2.G.
 11. Melli V, Chaudhry DR, Cornblath R. Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients. *Med (Baltim).* 2005; 84(6):377-385. doi: 10.1097/01.md.0000188565.48918.41.
 12. Dennis JM, Witting PK. Protective role for antioxidants in acute kidney disease. *Nutrients.* 2017 Jul 7; 9 (7):718. doi: 10.3390/nu9070718.
 13. Semenovitch DS, Plotnikov EY, Lukiyyenko EP, Astrowski AA, Kanunnikova NP. Protective effect of D-panthenol in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 14;23(20):12273. doi: 10.3390/ijms232012273.
 14. Gois PHF, Canale D, Volpini RA, Ferreira D, Veras MM, Andrade-Oliveira V, et al. Allopurinol attenuates rhabdomyolysis-associated acute kidney injury: Renal and muscular protection. *Free Radic Biol Med.* 2016 Dec;101:176-189. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.012. Epub 2016 Oct 18.
 15. Eswaran SV. Water soluble nanocarbon materials: a panacea for all? *Curr Sci.* 2018;114(9):1846-1850. doi: 10.18520/cs/v114/i09/1846-1850.
 16. Ferreira CA, Ni D, Rosenkrans ZT, Cai W. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials. *Nano Res.* 2018;11(11):4955-4984. doi: 10.1007/s12274-018-2092-y.
 17. Halenova T, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L, Prylutsky Yu, Ritter U, Scharff P. Evaluation of the biocompatibility of water-soluble pristine C60 fullerenes in rabbit. *BioNanoSci.* 2020;10(3):721-730.
 18. Nozdrenko D, Matvienko T, Vygovska O, Bogutska K, Motuziuk O, Nurishchenko N, et al. Protective effect of water-soluble C60 fullerene

- nanoparticles on the ischemia-reperfusion injury of the musculus soleus in rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6812. doi: 10.3390/ijms22136812.
19. Nozdrenko D, Matvienko T, Vygovska O, Soroca V, Bogutska K, Zholos A, et al. Post-traumatic recovery of musculus soleus in rats is improved via synergistic effect of C60 fullerene and TRPM8 agonist menthol. *Appl Nanoscience*. 2022;12(3):467-478. doi: 10.1007/s13204-021-01703-z.
 20. Bagley WH, Yang WH, Shah KH. Rhabdomyolysis. *Intern Emerg Med*. 2017;2(3):210-218.
 21. Khan FY. Rhabdomyolysis: a review of the literature. *Neth J Med*. 2009; 67:272-283.
 22. Gburek J, Birn H, Verroust PJ, Goj B, Jacobsen C, Moestrup SK, Willnow TE, Christensen EI. Renal uptake of myoglobin is mediated by the endocytic receptors megalin and cubilin. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285:F451-458.
 23. Cabral BMI, Edding SN, Portocarrero JP, Lerma EV. Rhabdomyolysis. *Dis Mon*. 2020;66(8):101015.
 24. Dawley C. Myalgias and Myopathies: Rhabdomyolysis. *FP Essent*. 2016;440:28-36.
 25. Esposito L, Estienne N, Serpieri N, et al. Rhabdomyolysis-Associated Acute Kidney Injury. *Am J Kidney Dis*. 2018;71(6):12-14.
 26. Fadila MF, Wool Fadila KJ, Fadila MF. Rhabdomyolysis secondary to influenza A infection: a case report and review of the literature. *Am J Med Sci*. 2015;(7):122–124.
 27. Alpers JP, Jones LK. Natural history of exertional rhabdomyolysis: a population-based analysis. *Musculus Nerve*. 2010;42:487-491.
 28. Bosch X, Poch E. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med*. 2009;361(1):62-72.
 29. Taxbro K, Kahlow H, Wulcan H, Fornarve K. Rhabdomyolysis and acute kidney injury in severe COVID-19 infection. *BMJ Case Rep*. 2020;13(9):237616.

30. Warren JD, Blumbergs PC, Thompson PD. Rhabdomyolysis: a review. *Musculus Nerve*. 2002;25(3):332-347.
31. Panizo N, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM. Molecular mechanisms and novel therapeutic approaches to rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Kidney Blood Press Res*. 2015;40(5):520-532.
32. Petejova N, Martinek A. Acute kidney injury due to rhabdomyolysis and renal replacement therapy: a critical review. *Crit Care*. 2014;18(3):224.
33. Kwiatkowska M, Chomicka I, Malyszko J. Rhabdomyolysis-induced acute kidney injury: an underestimated problem. *Wiad Lek*. 2020;73(11):2543-2548.
34. Omrani H, Najafi I, Bahrami K. Acute kidney injury following traumatic rhabdomyolysis in Kermanshah earthquake victims: a cross-sectional study. *Am J Emerg Med*. 2021;40:127-132.
35. Towner W, Leyden WA, Chao C. High risk of rhabdomyolysis and acute kidney injury after traumatic limb compartment syndrome. *Ann Plast Surg*. 2015;74(2):158-161.
36. Cabral BMI, Edding SN, Portocarrero JP, Lerma EV. Rhabdomyolysis. *Dis Mon*. 2020;66(8):101015.
37. Harrois A, Soyer B, Gauss T. Prevalence and risk factors for acute kidney injury among trauma patients: a multicenter cohort study. *Crit Care*. 2018;22(1):344.
38. Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis - an overview for clinicians. *Crit Care*. 2005;9(2):158-169.
39. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med*. 2009;361(1):62-72.
40. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med*. 2007;19(2):90-100.
41. Nance JR, Mammen AL. Diagnostic evaluation of rhabdomyolysis. *Musculus Nerve*. 2015;51(6):793-810.
42. Torres PA, Helmetetter JA, Kaye AM, Kaye AD. Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Ochsner J*. 2014;15(1):58-69.

43. Zutt R, van der Kooi AJ, Linthorst GE. Rhabdomyolysis: review of the literature. *Neuromuscul Disord*. 2014;24(8):651-659.
44. Al-Ismaili Z, Piccioni M, Zappitelli M. Rhabdomyolysis: pathogenesis of renal injury and management. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(10):1781-1788.
45. Better OS, Stein JH. Early management of shock and prophylaxis of acute renal failure in traumatic rhabdomyolysis. *N Engl J Med*. 2009;322(12):825-829.
46. Gordon WT, Talbot M, Shero JC. Acute extremity compartment syndrome and the role of fasciotomy in extremity war wounds. *Mil Med*. 2018;183(2):108-111.
47. Iraj N, Saeed S, Mostafa H. Prophylactic fluid therapy in crushed victims of Bam earthquake. *Am J Emerg Med*. 2011;29(7):738-742.
48. Malinoski DJ, Slater MS, Mullins RJ. Crush injury and rhabdomyolysis. *Crit Care Clin*. 2004;20(1):171-192.
49. Olson SA, Glasgow RR. Acute compartment syndrome in lower extremity musculoskeletal trauma. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005;13:436.
50. Minnema BJ, Neligan PC, Quraishi NA. A case of occult compartment syndrome and nonresolving rhabdomyolysis. *Intern Med*. 2008;23(6):871-874.
51. Cote DR, Fuentes RE, Elsayes AH. A "crush" course on rhabdomyolysis: risk stratification and clinical management update for the perioperative clinician. *J Anesth*. 2020;34(4):585-598.
52. Li L, Liu R. Rhabdomyolysis with acute anuria renal failure caused by surgical injection-induced tetanus in an adult. *Clin Med (Lond)*. 2021;21(1):103-105.
53. Lin C, Lin CM, Wang TL, Leu JG. Rhabdomyolysis in 119 students after repetitive exercise. *Br J Sports Med*. 2005;39(1):3.
54. Mukherjee A, Ghosh R, Aftab G. Rhabdomyolysis in a patient with coronavirus disease 2019. *Cureus*. 2020;12(7):8956.
55. Wołyniec W, Kasprowicz K, Giebułtowski J. Changes in water soluble uremic toxins and urinary acute kidney injury biomarkers after 10- and 100-km runs. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(21):4153.

56. Young SE, Miller MA, Docherty MA. Urine dipstick testing to rule out rhabdomyolysis in patients with suspected heat injury. *Am J Emerg Med.* 2009;27(7):875-877.
57. Mehta R, Fisher LE, Segeleon JE. Acute rhabdomyolysis complicating status asthmaticus in children: case series and review. *Pediatr Emerg Care.* 2006;22(8):587-591.
58. Chen YJ, Chang SH, Yuan R. Rhabdomyolysis after successful resuscitation of a patient with near-fatal asthma. *Am J Emerg Med.* 2007;25(6):3-4.
59. Chatzizisis SE, Misirli G, Hatzitolios AI, Giannoglou GD. The syndrome of rhabdomyolysis: complications and treatment. *Eur J Intern Med.* 2008;19(8):568-574.
60. Fadila MF, Wool KJ. Rhabdomyolysis secondary to influenza A infection: a case report and review of the literature. *Am J Med Sci.* 2015;(7):122-124.
61. Jin M, Tong Q. Rhabdomyolysis as potential late complication associated with COVID-19. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(7):1618-1620.
62. Hung CF, Huang TY, Lin PY. Hypothermia and rhabdomyolysis following olanzapine injection in an adolescent with schizophreniform disorder. *Gen Hosp Psychiatry.* 2009;31(4):376-378.
63. Gabow PA, Kaehny WD, Kelleher SP. The spectrum of rhabdomyolysis. *Medicine (Baltimore).* 2012;61(3):141-152.
64. Holoshitz N, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Relative safety of gemfibrozil and fenofibrate in the absence of concomitant cerivastatin use. *Am J Cardiol.* 2008;101(1):95-97.
65. Joy TR, Hegele RA. Narrative review: statin-related myopathy. *Ann Intern Med.* 2009;150(12):858-868.
66. Godinho R, Bugnon S, Gracin T, Tataw J. Severe rhabdomyolysis-induced acute kidney injury following concomitant use of Genvoya® (EVG/COBI/FTC/TAF) and simvastatin: a case report. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):69.

67. Graham DJ, Staffa JA, Shatin D. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA*. 2004;292(21):2585-2590.
68. Prendergast BD, George TF. Drug-induced rhabdomyolysis: mechanisms and management. *Postgrad Med J*. 2015;89:342-346.
69. O'Carroll C, Fenwick R. Rhabdomyolysis: a case-based critical reflection on its causes and diagnosis. *Emerg Nurse*. 2020;28(3):24-28.
70. Kamijo Y, Takai M, Fujita Y, Sakamoto T. A multicenter retrospective survey of poisoning after consumption of products containing novel psychoactive substances from 2013 to 2014 in Japan. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2016;42(5):513-519.
71. Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis – an overview for clinicians. *Crit Care*. 2005;9(2):158-169.
72. Janković SR, Stosić JJ, Vucinić S. Causes of rhabdomyolysis in acute poisonings. *Vojnosanit Pregl*. 2013;70(11):1039-1045.
73. Sitprija V. Animal toxins and the kidney. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(11):616-627.
74. Strachan D, Prisco A, Multz S. Recurrent rhabdomyolysis associated with polydipsia-induced hyponatremia – a case report and review of the literature. *Gen Hosp Psychiatry*. 2007;29(2):172-174.
75. Luck RP, Verbin S. Rhabdomyolysis: a review of clinical presentation, etiology, diagnosis, and management. *Pediatr Emerg Care*. 2008;24(4):262-281.
76. Meegada S, Muppidi V, Wilkinson DC. Coronavirus Disease 2019 – induced rhabdomyolysis. *Cureus*. 2020;12(8):10123.
77. Nauss MD, Schmidt EL, Pancioli AM. Viral myositis leading to rhabdomyolysis: a case report and literature review. *Am J Emerg Med*. 2009;27(3):5-6.
78. Pirounaki M, Liatsos G, Elefsiniotis I. Unusual onset of varicella zoster reactivation with meningoencephalitis, followed by rhabdomyolysis and renal

- failure in a young, immunocompetent patient. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(1):90-93.
79. Turhan V, Atasoyu EM, Kucukardali Y. Leptospirosis presenting as severe rhabdomyolysis and pulmonary haemorrhage. *J Infect*. 2006;52(1):1-2.
 80. Song SH, Lee DW, Lee SB, Kwak IS. Rhabdomyolysis caused by strenuous computer gaming. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(4):1263-1264.
 81. Wang L, Hong S, Huang H, Yang M. Rhabdomyolysis following status epilepticus with hyperuricemia: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(11):11281.
 82. Ramachandran R, Wierzbicki AS. Statins, musculus disease and mitochondria. *J Clin Med*. 2017;6(8):1047-1051.
 83. Scheuerman O, Wanders RJ, Waterham HR. Mitochondrial trifunctional protein deficiency with recurrent rhabdomyolysis. *Pediatr Neurol*. 2009;40(6):465-467.
 84. Sever MS, Vanholder R, Lameire N. Management of crush-related injuries after disasters. *N Engl J Med*. 2006;354(10):1052-1063.
 85. Elsayed EF, Reilly RF. Rhabdomyolysis: a review, with emphasis on the pediatric population. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(1):7-18.
 86. Dunphy L, Morhij R, Tucker S. Rhabdomyolysis-induced compartment syndrome secondary to atorvastatin and strenuous exercise. *BMJ Case Rep*. 2017;218942.
 87. Scalco RS, Snoeck M, Quinlivan R. Exertional rhabdomyolysis: physiological response or manifestation of an underlying myopathy? *BMJ Open Sport Exerc Med*. 2016;2:135-145.
 88. Ahn SC. Neuromuscular complications of statins. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2008;19(1):47-59.
 89. Chen Y, Lin YR, Zhao LL. Clinical spectrum of rhabdomyolysis presented to pediatric emergency department. *BMC Pediatr*. 2013;13:134.

90. Frydrychowicz C, Pasięka B, Pierer M. Colchicine triggered severe rhabdomyolysis after long-term low-dose simvastatin therapy: a case report. *J Med Case Rep.* 2017;11(1):8.
91. Brown CV, Rhee P, Chan L. Preventing renal failure in patients with rhabdomyolysis: do bicarbonate and mannitol make a difference? *J Trauma.* 2004;56(6):1191-1196.
92. Chung JJ, Cho ES, Choi JM, Yu JS. Retrospective comparison of renal ultrasonographic and clinical findings in patients with rhabdomyolysis. *Med Ultrasound.* 2020;28(3):151-155.
93. Beetham R. Biochemical investigation of suspected rhabdomyolysis. *Ann Clin Biochem.* 2000;37(5):581-587.
94. Neilsen JS, Sally M, Mullins RJ. Bicarbonate and mannitol treatment for traumatic rhabdomyolysis revisited. *Am J Surg.* 2017;213:73-79.
95. Crum-Cianflone NF. Bacterial, fungal, parasitic, and viral myositis. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:473-494.
96. Somagutta MR, Pagad S, Sridharan S. Role of bicarbonates and mannitol in rhabdomyolysis: a comprehensive review. *Cureus.* 2020;12(8):9742.
97. de Meijer R, Fikkers BG, de Keijzer MH. Serum creatine kinase as predictor of clinical course in rhabdomyolysis: a 5-year intensive care survey. *Intensive Care Med.* 2003;29:1121-1125.
98. Mannix R, Tan ML, Wright R, Baskin M. Acute pediatric rhabdomyolysis: causes and rates of renal failure. *Pediatrics.* 2006;118(5):2119-2125.
99. Safari S, Yousefifard M, Hashemi B. The value of serum creatine kinase in predicting the risk of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Nephrol.* 2016;20(2):153-161.
100. Yang CW, Li S, Dong Y. Epidemiology and the impact of acute kidney injury on outcomes in patients with rhabdomyolysis. *J Clin Med.* 2021;10(9):1950.

101. Poorsarvi Tehrani, Malek H. Early detection of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury through machine learning approaches. *Arch Acad Emerg Med.* 2021;9(1):29.
102. Holt K, Moore K. Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin. *Exp Nephrol.* 2000;8(2):72-76.
103. Kasaoka M, Todani M, Kaneko T. Peak value of blood myoglobin predicts acute renal failure induced by rhabdomyolysis. *J Crit Care.* 2010;25(4):601-604.
104. Zorova LD, Pevzner IB, Chupyrkina AA. The role of myoglobin degradation in nephrotoxicity after rhabdomyolysis. *Chem Biol Interact.* 2016;256:64-70.
105. Buitendag JJP, Patel MQ, Variawa S. Venous bicarbonate and creatine kinase as diagnostic and prognostic tools in the setting of acute traumatic rhabdomyolysis. *S Afr Med J.* 2021;111(4):333-337.
106. Chavez LO, Leon M, Einav S, Varon J. Beyond musculus destruction: a systematic review of rhabdomyolysis for clinical practice. *Crit Care.* 2016;20(1):135.
107. Vanholder R, Sever MS, Lameire N. Kidney problems in disaster situations. *Nephrol Ther.* 2021;17:27-36.
108. Donati G, Cappuccilli M, Di Filippo F. The use of supra-hemodiafiltration in traumatic rhabdomyolysis and acute kidney injury: A case report. *Case Rep Nephrol Dial.* 2021;11(1):26-35.
109. Ronco C. Extracorporeal therapies in acute rhabdomyolysis and myoglobin clearance. *Crit Care.* 2005;9:141-142.
110. Guzman N, Podoll AS, Bell CS, Finkel KW. Myoglobin removal using high-volume high-flux hemofiltration in patients with oliguric acute kidney injury. *Blood Purif.* 2013;36(2):107-111.
111. Lappalainen H, Tiula E, Uotila L, Mänttari M. Elimination kinetics of myoglobin and creatine kinase in rhabdomyolysis: implications for follow-up. *Crit Care Med.* 2002;30(10):2212-2215.

112. Masakane I, Sakurai K. Current approaches to middle molecule removal: room for innovation. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(3):12-21.
113. Mikkelsen TS, Toft P. Prognostic value, kinetics and effect of CVVHDF on serum of the myoglobin and creatine kinase in critically ill patients with rhabdomyolysis. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49(6):859-864.
114. Heyne N, Guthoff M, Krieger K. High cut-off renal replacement therapy for removal of myoglobin in severe rhabdomyolysis and acute kidney injury: a case series. *Nephron Clin Pract*. 2012;121(3-4):159-164.
115. Naka T, Jones D, Baldwin I. Myoglobin clearance by super high-flux hemofiltration in a case of severe rhabdomyolysis: a case report. *Crit Care*. 2005;9(2):90-95.
116. Premru V, Kovač J, Buturović-Ponikvar J, Ponikvar R. Some kinetic considerations in high cut-off hemodiafiltration for acute myoglobinuric renal failure. *Ther Apher Dial*. 2013;17(4):396-401.
117. Weidhase L, De Fallois J, Haußig E. Myoglobin clearance with continuous veno-venous hemodialysis using high cutoff dialyzer versus continuous veno-venous hemodiafiltration using high-flux dialyzer: a prospective randomized controlled trial. *Crit Care*. 2020;24(1):644.
118. Gubensek V, Persic A, Jerman V, Premru V. Extracorporeal myoglobin removal in severe rhabdomyolysis with high cut-off membranes - intermittent dialysis achieves much greater clearances than continuous methods. *Crit Care*. 2021;25(1):97.
119. Shape Effect of Carbon Nanovectors on Angiogenesis. *ACS Nano*. 2010;4:574-582. doi: 10.1021/nn901465h.
120. Lee DE. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem Soc Rev*. 2012;41:2656-2672. doi: 10.1039/C2CS15261D.
121. Lee H. Hand-ground fullerene-nanodiamond composite for photosensitized water treatment and photodynamic cancer therapy. *J Colloid Interface Sci*. 2021;587:101-109. doi: 10.1016/j.jcis.2020.12.020.

122. Chen YW. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:21-26. doi: 10.1152/ajpregu.00310.2003.
123. Chen Z. Polyhydroxylated metallofullerenols stimulate IL-1 β secretion of macrophages through TLRs/MyD88/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome activation. *Small*. 2014;10:2362-2372. doi: 10.1002/smll.201302825.
124. Gharbi N. C60 Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Letters*. 2005;5(12):2578-2585.
125. Slater TF, Cheeseman KH, Ingold KU. Carbon-tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;311(1152):633-645.
126. Dimitrijevic NM. Reaction of trichloromethyl and trichloromethylperoxyl radicals with C-60: a pulse-radiolysis study. *Chem Phys Lett*. 1992;94(4-6):457-460.
127. Yudoh K. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis. *Int J Nanomedicine*. 2009;4:217-225.
128. Yudoh K, Shishido K, Murayama H, et al. Water-soluble C60 fullerene prevents degeneration of articular cartilage in osteoarthritis via down-regulation of chondrocyte catabolic activity and inhibition of cartilage degeneration during disease development. *Arthritis Rheumatism*. 2007;56(10):3307-3318.
129. Baati T. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of C60 fullerene. *Biomaterials*. 2012;33(19):4936-4946.
130. Makarova EG. Fullerene C60 prevents neurotoxicity induced by intrahippocampal microinjection of amyloid-beta peptide. *J Nanoscience Nanotechnol*. 2012.
131. Ding QX, Dimayuga E, Keller JN. Oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2007;4(1):73-79.

132. Kim JE, Lee M. Fullerene inhibits beta-amyloid peptide aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(2):576-579.
133. Dugan LL. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(17):9434-9439.
134. Gao J, Wang HL, Shreve A, Iyer R. Fullerene derivatives induce premature senescence: A new toxicity paradigm or novel biomedical applications. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;244(2):130-143.
135. Ueng TH, Kang JJ, Wang HW, et al. Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullerenol, a polyhydroxylated fullerene C-60. *Toxicol Lett*. 1997;93(1):29-37.
136. Chen HH, Yu C, Ueng TH, et al. Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C-60 in rats. *Toxicol Pathol*. 1998;26(1):143-151.
137. Da Ros T, Spalluto G, Prato M. Biological applications of fullerene derivatives: A brief overview. *Croat Chem Acta*. 2001;74(4):743-755.
138. Moussa F, Trivin F, Ceolin R, et al. Early effects of C-60 administration in Swiss mice: A preliminary account for in vivo C-60 toxicity. *Fullerene Sci Technol*. 1996;4(1):21-29.
139. Scrivens WA, Rawlett AM, Tour JM. Preparative benchtop enrichment of C-60, C-70, and the higher fullerene allotropes using a brominated polystyrene stationary phase. *J Org Chem*. 1997;62(8):2310-2311.
140. Mori T, Takada H, Ito S, et al. Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis. *Toxicol*. 2006;225(1):48-54.
141. Nelson MA, Domann FE, Bowden GT, et al. Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin. *Toxicol Ind Health*. 1993;9(4):623-630.
142. Hendrickson OD, Fedyunina NS, Zherdev AV, Solopova ON, Sveshnikov PG, Dzantiev BB. Production of monoclonal antibodies against fullerene C-60

- and development of a fullerene enzyme immunoassay. *Analyst*. 2012;137(1):98-105.
143. Sayes CM. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Letters*. 2000.
 144. Marcus Y. Solubility of C60 fullerene. *J Phys Chem B*. 2001;105(13):2499-2506.
 145. Semenov KN. Solubility of light fullerenes in organic solvents. *J Chem Eng Data*. 2010;55(1):13-36.
 146. Choi JI. Interaction of C60 with water: First-principles modeling and environmental implications. *Environ Sci Technol*. 2015;49(6):3442-3449.
 147. Monti D, Moretti L, Salvioli S, Straface E, Malorni W, Pellicciari R, Schettini G, Bisaglia M, Pincelli C, Fumelli C, et al. C60 carboxyfullerene exerts a protective activity against oxidative stress-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277(3):711-717.
 148. Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Klochkov VK, Andrievsky GV. Nanostructures of hydrated C60 fullerene (C60HyFn) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals. *Toxicology*. 2008;246(2-3):158-165.
 149. Nozdrenko D, Matvienko T, Vygovska O, Scharff P, Ritter U. Protective effect of water-soluble C60 fullerene nanoparticles on the ischemia-reperfusion injury of the musculus soleus in rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6812.
 150. Prylutsky Yu, Nozdrenko D, Gonchar O, Prylutska S, Bogutska K, Hromovyk B, Scharff P, Ritter U. Fullerene attenuates musculus force reduction in a rat during fatigue development. *Heliyon*. 2022;8(12):e12449. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12449.
 151. Nozdrenko D, Prylutska S, Bogutska K, Nurishchenko NY, Abramchuk O, Motuziuk O, Prylutsky Y, Scharff P, Ritter U. Effect of C60 fullerene on recovery of musculus soleus in rats after atrophy induced by achillotenotomy. *Life*. 2022;12:332.

152. Nozdrenko D, Matvienko T, Vygovska O, Soroca V, Bogutska K, Zholos A, Scharff P, Ritter U, Prylutsky Yu. Post-traumatic recovery of musculus soleus in rats is improved via synergistic effect of C60 fullerene and TRPM8 agonist menthol. *Appl Nanoscience*. 2022;12(3):467-478. doi: 10.1007/s13204-021-01703-z.
153. Nozdrenko D, Abramchuk O, Prylutska S, Vygovska O, Soroca V, Bogutska K, Khrapatyi S, Prylutsky Yu, Scharff P, Ritter U. Analysis of biomechanical parameters of musculus soleus contraction and blood biochemical parameters in rat with chronic glyphosate intoxication and therapeutic use of C60 fullerene. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4977.
154. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg, 1986.
155. Закон України “Про захист тварин від жорстокого поводження”. № 3446-IV від 21 лютого 2006 р. URL: <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
156. Закон України “Про відходи”. № 187/98 від 5 березня 1998 р. URL: <http://sfs.gov.ua/zakonodavstvo/podatkovе-zakonodavstvo/normativno-pravovi-akti-zpitankpr/zakoniukraini/61760.html>.
157. Souza JD, Gottfried C. Musculus injury: review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol*. 2013;23(6):1253-1260. doi: 10.1016/j.jelekin.2013.07.009.
158. Stewart IJ, Faulk TI, Sosnov JA, Clemens MS, Elterman J, Ross JD, Howard JT, Fang R, Zonies DH, Chung KK. Rhabdomyolysis among critically ill combat casualties: Associations with acute kidney injury and mortality. *J Trauma Acute Care Surg*. 2016;80(3):492-498.
159. Heegard KD, Stewart IJ, Cap AP, Sosnov JA, Kwan HK, Glass KR, Morrow BD, Latack W, Henderson AT, Saenz KK, Siew ED, Ikizler TA, Chung KK. Early acute kidney injury in military casualties. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015;78(5):988-993.

160. Motuziuk O, Nozdrenko D, Prylutska S, Vareniuk I, Bogutska K, Braniuk S, Korotkyi O, Prylutsky Yu, Ritter U, Piosik J. The effect of C60 fullerene on the mechanokinetics of musculus gastrocnemius contraction in chronically alcoholized rats. *Heliyon*. 2023 Jul 27;9(8):e18745.
161. Tarazona V, Figueiredo S, Hamada S, Pochard J, Haines RW, Prowle JR, Duranteau J, Vigué B, Harrois A. Admission serum myoglobin and the development of acute kidney injury after major trauma. *Ann Intensive Care*. 2021;11:140.
162. Candela N, Silva S, Georges B, Cartery C. Short- and long-term renal outcomes following severe rhabdomyolysis: a French multicenter retrospective study of 387 patients. *Ann Intensive Care*. 2020 Mar 2;10(1):27.
163. Sheerin NS, Sacks SH. Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link? *Clin Exp Immunol*. 2002;130:1-3. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01979.x.
164. Zager A. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int*. 1996;49:314-326. doi: 10.1038/ki.1996.48.
165. Eriksson M, Brattström O, Mårtensson J, Larsson E, Oldner A. Acute kidney injury following severe trauma: Risk factors and long-term outcome. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015 Sep;79(3):407-412.