

PACS numbers: 62.20.me, 81.16.Fg, 82.39.Jn, 87.16.dp, 87.16.dr, 87.16.Tb, 87.19.Ff

Розвиток повільної та швидкої втоми скелетних м'язів щурів за внутрішньом'язових ін'єкцій водорозчинних C₆₀-фуллеренів

Д. М. Ноздренко, К. І. Богущька, І. В. Пампуха, Ю. І. Прилуцький

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64,
01601 Київ, Україна

Показано, що внутрішньом'язові ін'єкції водорозчинних C₆₀-фуллеренів (доза 0,5 мг/кг) подовжують час настання втоми скелетного м'яза щурів внаслідок їхнього впливу на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз м'язової тканини. Вперше встановлено, що після введення C₆₀-фуллеренів пониження сили скорочення м'яза на 50% рівня від початкових значень відбувається практично у два рази повільніше, ніж у контролі, за стимуляції у 1 Гц (повільна втома м'яза) та на 45–55% повільніше за подразнення частотою у 2 Гц (швидка втома м'яза). Одержані дані свідчать про складність визначення оптимального моделю терапевтичного впливу C₆₀-фуллеренів на процеси втоми скелетної мускулатури, що потребує подальших досліджень *in vivo*.

Intramuscular injections of water-soluble C₆₀ fullerenes (of 0.5 mg/kg dose) are shown to prolong the time of onset of skeletal muscle fatigue of rats due to their effect on the prooxidant–antioxidant muscle homeostasis. For the first time, it was found that, after the introduction of C₆₀ fullerenes, the decrease of muscle-contraction force by 50% from the initial values is almost twice as slow as in control with stimulation of 1 Hz (slow muscle fatigue) and by 45–55% slower than stimulation with a frequency of 2 Hz (rapid muscle fatigue). The obtained data indicate the difficulty of determining the optimal model of therapeutic effect of C₆₀ fullerenes on the processes of skeletal muscle fatigue that requires further research *in vivo*.

Ключові слова: скелетний м'яз, динаміка м'язового скорочення, втома, C₆₀-фуллерен.

Key words: skeletal muscle, dynamics of muscle contraction, fatigue, C₆₀ fullerene.

(Отримано 31 березня 2021 р.)

1. ВСТУП

Розуміння процесів формування втоми скелетних м'язів як захисного механізму від перевантажень організму є важливим для оцінки та «ключем» відновлення їхніх функціональних можливостей. Процес запобігання та корекції наслідків втоми — актуальна проблема, оскільки вона може проявлятися після різних за інтенсивністю та тривалістю фізичних навантажень і призводити до гострих, а згодом і хронічних патологічних процесів, значно понижуючи працездатність та якість життя людини загалом [1]. Фізіологічні порушення у функціонуванні м'язів з виникненням симптоматики втоми відбуваються під час отруєнь і механічних травм [2, 3]. Відомо, що в процесі формування м'язової втоми має місце порушення метаболізму [4], утворюються продукти неповного окиснення кисню (активні форми кисню (АФК)) [5]. Надмірне накопичення АФК (оксидативний стрес) може призводити до значних функціональних порушень, оскільки пошкоджуються різні компоненти клітин [6]. Прикладом цього є ініціювання перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) біологічних мембран клітин, що сприяє порушенню їхньої структури та підвищенню проникності [7]. Захист клітини від таких пошкоджень забезпечується антиоксидантною системою організму. Як потенційні екзогенні антиоксиданти для корекції прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу м'язової тканини за різних патологій можуть розглядатися біосумісні та водорозчинні C_{60} -фуллерени [8–10]. Вони легко приєднують до шістьох електронів і завдяки цьому можуть діяти як потужні вловлювачі АФК у системах *in vitro* та *in vivo* [11–13].

Антиоксидантні властивості водорозчинних наночастинок C_{60} -фуллеренів були випробувані за умов експериментальної ішемії м'язів, отруєнь і механічних травм [14–16]. Водночас, наявні експериментальні дані вказують на те, що у формуванні макропоказників нервово-м'язової активності бере участь значна кількість надзвичайно складних (нелінійних і нестационарних) процесів [17]. Вплив на ці процеси патологічних чинників веде або до повної дисфункції цих параметрів, або їхнього розсинхронізування. Внаслідок цього м'яз як динамічна система не здатний адекватно реалізовувати пули нейронної активності, що надходять з ЦНС [18]. Одним з відкритих питань досі залишається фізіологічна відмінність між формуванням швидкої втоми м'язів та її повільним виникненням. Важливість його вирішення пов'язана з адаптаційною корекцією патологій втоми різної генези.

Відтак, метою роботи було оцінити терапевтичний вплив водорозчинних C_{60} -фуллеренів на динаміку скорочення скелетного м'яза щурів за формування швидкої та повільної втоми внаслідок його тривалої активації.

2. МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Досліди на щурах виконували з дотриманням міжнародних рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин. Протокол дослідження був затверджений комісією з питань біоетики Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно з правилами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» і нормами біомедицини етики, згідно із Законом України №3446-IV від 21.02.2006 р. (м. Київ) «Про захист тварин від жорстокого поводження» під час проведення медико-біологічних досліджень.

Для дослідження були використані щури-самці лінії Wistar масою у 135–140 г ($n = 6$). При підготовці до експерименту анестезію тварин здійснювали внутрішньочеревним введенням нембуталу (40 мг/кг). Стандартна підготовка поряд з вищезазначеними заходами включала канюлювання (*a. carotis communis sinistra*) для введення фармпрепаратів і вимірювання тиску, трахеотомію, ламінектомію на рівні поперекового відділу спинного мозку. Камбалоподібний м'яз (*muscle soleus*) щура звільняли від оточуючих тканин; у дистальній частині перерізували його сухожилкову частину упоперек. Для підготовки до модульованої електростимуляції еферентів у сегментах L7-S1 перерізували вентральні корінці безпосередньо у місцях їхнього виходу зі спинного мозку.

Силу скорочення м'яза вимірювали за допомогою системи тензодатчиків, до передньої частини яких приєднувався сухожилок досліджуваного м'яза [19]. Для формування стимулювальних сигналів використовували програмовані генератори сигналів спеціальної форми [20]. Розподілена стимуляція уможливила одержувати монотонне й однорідне скорочення м'яза за низькочастотної стимуляції окремих філаментів. Стимуляцію здійснювали електричними імпульсами частотою в 1 (повільна втома м'яза) та 2 (швидка втома м'яза) Гц через платинові електроди. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів. Збурення навантаження здійснювали лінійним електромагнетним двигуном.

Інтегровану потужність м'яза розраховували як загальну площу під силовою кривою та представляли у відсотках від контрольних значень непошкодженого м'яза, яку брали за 100%. Цей параметер є маркером загальної працездатності м'яза за застосованих стимуляційних пулів. Його аналіза уможливорює оцінити м'язову активність у системі рівноваги «сила–зовнішнє навантаження», що є фізіологічним аналогом працездатності м'язової системи загалом, тобто визначає роботу, яку може виконати м'яз за одиницю часу за умов експерименту [19].

Для одержання водорозчинних C_{60} -фуллеренів було застосовано методу, яка ґрунтується на переведенні молекули C_{60} з толуолу у водну фазу з подальшим обробленням ультразвуком [21, 22]. Одержаний водний розчин C_{60} -фуллеренів є типовим колоїдним розчином, який містить як поодинокі молекули C_{60} ($\cong 0,7$ нм), так і її наноагрегати діаметром $\cong 1,2-100$ нм [23]. Крім того, він виявився стабільним упродовж 18 місяців за температури у $+4^\circ\text{C}$.

Терапевтичні ін'єкції C_{60} -фуллеренів у дозі 0,5 мг/кг маси тварини здійснювали внутрішньом'язово за 1 год до початку експерименту. Зазначимо, що використана доза C_{60} -фуллеренів є набагато нижчою за значення LD_{50} , яке становило 600 мг/кг ваги тіла за перорального введення щурам [24] та 721 мг/кг за внутрішньочеревного введення мишам [25].

Статистичне оброблення результатів досліджень проводили за методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 8.0.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій серії експериментів для забезпечення тривалого розвитку процесу втоми було проведено стимуляцію *muscle soleus* щурів електричними імпульсами частотою в 1 Гц без періоду релаксації. Час досягнення силою скорочення 50% рівня від початкових значень складав 3080 с (рис. 1 і 2). Зауважимо, що такі часові рамки характерні лише у випадку нативних щурів: навіть невелике пошкодження м'язів або отруєння їх веде до істотних змін цього параметра [26, 27]. Аналіза механограм м'язів після введення C_{60} -фуллеренів показала, що за весь період стимуляції (3600 с) сила скорочення м'яза не зменшувалася до 50% рівня від контролю; таке зменшення відбулося лише після 4300 с стимуляції. Інтегрована потужність м'яза збільшилася на 47% порівняно з контрольним значенням після введення C_{60} -фуллерену (рис. 2).

За стимуляції частотою у 2 Гц час досягнення силою скорочення м'яза 50% рівня від контролю істотно зменшився та склав 1890 с, а після ін'єкцій C_{60} -фуллеренів цей час збільшився до 2340 с. Інтегрована потужність м'яза за стимуляції у 2 Гц збільшилася на 29% порівняно з контрольним значенням. Слід відзначити, що після введення C_{60} -фуллеренів сила ізометричного скорочення м'язів після деякого пониження знову досягала стаціонарного рівня. Це підтверджує те, що без введення препарату відбувається постійне пониження рівня розвитку сили скорочення м'яза упродовж усього періоду стимуляції, тоді як після аплікації C_{60} -фуллеренів таке пониження істотно сповільнюється.

Дані, одержані в експериментах (рис. 1 і 2), свідчать про те, що пониження сили скорочення м'яза після терапевтичного введення

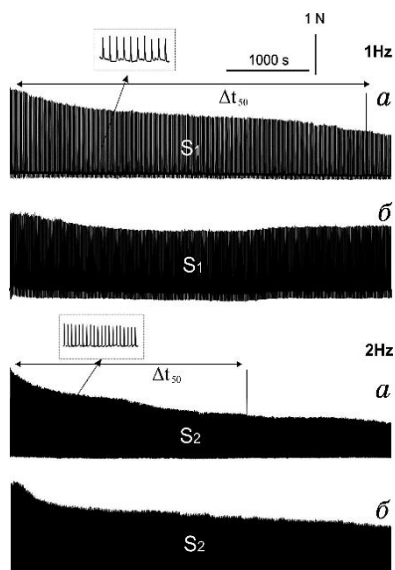


Рис. 1. Криві генерації сили скорочення *muscle soleus* щурів, викликані безрелаксаційним подразненням електростимуляцією частотою в 1 і 2 Гц та тривалістю у 3600 с: механограми м'язів у контролі (а); механограми м'язів за терапевтичного введення C₆₀-фуллеренів (б); Δt_{50} — час зменшення максимальної сили скорочення до 50% від початкового рівня; S_1 і S_2 — інтегрована потужність м'яза за весь період стимуляційного подразнення частотою в 1 і 2 Гц відповідно.¹

C₆₀-фуллеренів відбувається практично у два рази повільніше, ніж у контролі, за стимуляції в 1 Гц та на 45–55% повільніше за подразнення частотою у 2 Гц. Максимально достовірне зменшення рівня сили, яку розвиває м'яз у межах усього періоду стимуляції за втоми після аплікації препарату, становило 23–26%, у той час як у контролі цей показник складав 56–58%. Також для усіх експериментальних тварин спостерігали різке падіння рівня зусилля у контролі й утримання або повільне його пониження після ін'єкції C₆₀-фуллеренів. Це підтверджує одержані раніше дані щодо протекторного ефекту водорозчинних C₆₀-фуллеренів на функції імунної й антиоксидантної систем організму при запальних процесах [28–30]. Виявлені механізми дії цього препарату можуть позитивно впливати на процеси витривалості та відновлення активного функціонування м'яза за інактивації продуктів його метаболізму.

ВИСНОВОК

Таким чином, введення водорозчинних C₆₀-фуллеренів за низької

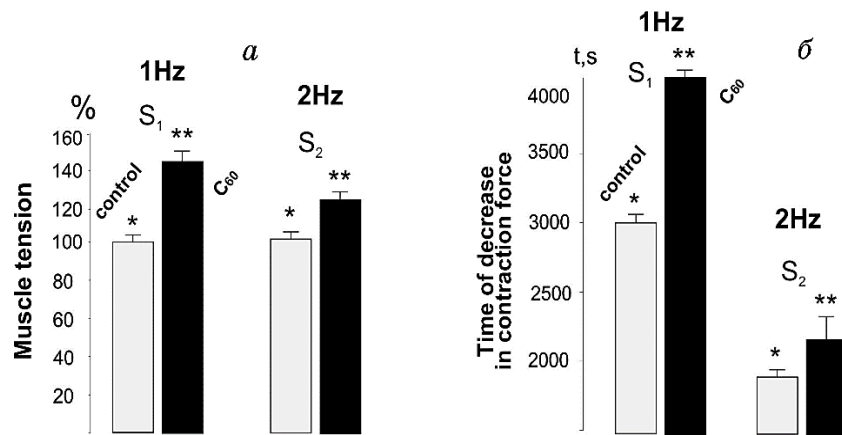


Рис. 2. Динамічні параметри скорочення *muscle soleus* щурів, викликані безрелаксаційним подразненням електростимуляцією частотою в 1 і 2 Гц та тривалістю у 3600 с: зміна інтегрованої потужності м'яза (а); зміна часу досягнення 50% рівня максимальної сили скорочення м'яза (б). * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ відносно групи *control*.²

терапевтичної дози веде до подовження часу настання втоми скелетного м'яза щурів і, відповідно, його активного функціонування аж до появи істотних проявів втоми. Причиною цього, поряд з потенційними іншими молекулярними механізмами, є вплив C₆₀-фуллеренів як потужних антиоксидантів на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз м'язової тканини щурів.

Водночас встановлено, що терапевтичні ін'єкції C₆₀-фуллеренів істотно впливають саме на розвиток повільної втоми м'яза порівняно з розвитком його швидкої втоми. Одержані результати вказують на складність визначення оптимального моделю терапевтичного впливу C₆₀-фуллеренів на процеси втоми скелетної мускулатури, необхідного для корекції її за широкого спектру можливих рухів.

Відтак, подальші системні дослідження *in vivo* сприятимуть розробці ефективних медичних нанотехнологій із застосуванням C₆₀-фуллеренів для профілактики втоми скелетних м'язів.

Автори висловлюють вдячність МОН України за надану фінансову підтримку для проведення цих досліджень.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. H. Johansson, U. Windhorst, M. Djupsjöbacka, and M. Passatore (Gävle, Sweden: Univ. Press: 2003); <https://doi.org/10.1080/10582450802162265>
2. O. M. Khoma, D. A. Zavodovs'kyi, D. N. Nozdrenko, O. V. Dolhopolov,

- M. S. Miroshnychenko, and O. P. Motuziuk, *Fiziol. Zh.*, **60**, No. 1: 34 (2014); <https://doi.org/10.15407/fz60.01.034>
3. D. M. Nozdrenko, M. S. Miroshnychenko, V. M. Soroca, L. V. Korchinska, and D. O. Zavodovskiy, *Ukr. Biochem. J.*, **88**, No. 2: 82 (2016); <https://doi.org/10.15407/ubj88.02.082>
 4. U. F. Ervilha, D. Farina, L. Arendt-Nielsen, and T. Graven-Nielsen, *Exp. Brain Res.*, **164**, No. 2: 215 (2005); [doi:10.1007/s00221-005-2244-7](https://doi.org/10.1007/s00221-005-2244-7)
 5. D. G. Allen, G. D. Lamb, and H. Westerblad, *Physiol. Rev.*, **88**, No. 1: 287 (2008); [doi:10.1152/physrev.00015.2007](https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007)
 6. D. Martarelli and P. Pompei, *J. Sports Med. Phys. Fitness*, **49**, No. 1: 122 (2009).
 7. C. Richter, *Chem. Phys. Lipids*, **44**, Nos. 2–4: 175 (1987); [doi:10.1016/0009-3084\(87\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90049-1)
 8. I. V. Vereshchaka, N. V. Bulgakova, A. V. Maznychenko, O. O. Gonchar, Yu. I. Prylutsky, U. Ritter, W. Moska, T. Tomiak, D. M. Nozdrenko, I. V. Mishchenko, and A. I. Kostyukov, *Front. Physiol.*, **9**: 517 (2018); [doi:10.3389/fphys.2018.00517](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00517)
 9. O. O. Gonchar, A. V. Maznychenko, N. V. Bulgakova, I. V. Vereshchaka, T. Tomiak, U. Ritter, Yu. I. Prylutsky, I. M. Mankovska, and A. I. Kostyukov, *Oxidative Med. Cell. Longev.*, **2018**: 2518676 (2018); [doi:10.1155/2018/2518676](https://doi.org/10.1155/2018/2518676)
 10. T. Halenova, N. Raksha, O. Savchuk, L. Ostapchenko, Yu. Prylutsky, U. Ritter, and P. Scharff, *BioNanoSci.*, **10**, No. 3: 721 (2020).
 11. T. I. Halenova, I. M. Vareniuk, N. M. Roslova, M. E. Dzerzhynsky, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko, Yu. I. Prylutsky, U. Ritter, and P. Scharff, *RSC Adv.*, **6**: 100046 (2016); <https://doi.org/10.1039/C6RA20291H>
 12. T. Halenova, N. Raksha, T. Vovk, O. Savchuk, L. Ostapchenko, Yu. Prylutsky, O. Kyzyma, U. Ritter, and P. Scharff, *Int. J. Obes.*, **42**, No. 12: 1987 (2018); [doi:10.1038/s41366-018-0016-2](https://doi.org/10.1038/s41366-018-0016-2)
 13. H. M. Kuznietsova, O. V. Lynchak, N. V. Dziubenko, V. L. Osetskyi, O. V. Ogloblya, Yu. I. Prylutsky, V. K. Rybalchenko, U. Ritter, and P. Scharff, *Appl. Nanosci.*, **9**, No. 5: 601 (2019); [doi:10.1007/s13204-018-0700-5](https://doi.org/10.1007/s13204-018-0700-5)
 14. S. Yu. Zay, D. A. Zavodovskiy, K. I. Bogutska, D. N. Nozdrenko, and Yu. I. Prylutsky, *Fiziol. Zh.*, **62**, No. 3: 66 (2016); [doi:10.15407/fz62.03.066](https://doi.org/10.15407/fz62.03.066)
 15. D. M. Nozdrenko, D. O. Zavodovsky, T. Yu. Matvienko, S. Yu. Zay, K. I. Bogutska, Yu. I. Prylutsky, U. Ritter, and P. Scharff, *Nanoscale Res. Lett.*, **12**, No. 1: 115 (2017); [doi:10.1186/s11671-017-1876-4](https://doi.org/10.1186/s11671-017-1876-4)
 16. D. N. Nozdrenko, T. Yu. Matvienko, O. V. Vygovska, V. M. Soroca, K. I. Bogutska, N. E. Nuryshchenko, Yu. I. Prylutsky, and A. V. Zholos, *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, **18**, No. 1: 205 (2020); <https://doi.org/10.15407/nnn.18.01.205>
 17. D. N. Nozdrenko, A. N. Shut, and Yu. I. Prylutsky, *Biopolym. Cell*, **21**, No. 1: 80 (2005); <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0006E0>
 18. D. N. Nozdrenko and K. I. Bogutska, *Biopolym. Cell*, **21**, No. 3: 283 (2005); <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0006F3>
 19. D. N. Nozdrenko, S. M. Berehovyi, N. S. Nikitina, L. I. Stepanova,

- T. V. Beregova, and L. I. Ostapchenko, *Biomed. Res.*, **29**, No. 19: 3629 (2018); doi:10.4066/biomedicalresearch.29-18-1055
20. D. M. Nozdrenko, O. M. Abramchuk, V. M. Soroca, and N. S. Miroschnichenko, *Ukr. Biochem. J.*, **87**, No. 5: 38 (2015); doi:10.15407/ubj87.05.038
21. A. Golub, O. Matyshevska, S. Prylutska, V. Sysoyev, L. Ped, V. Kudrenko, E. Radchenko, Yu. Prylutsky, P. Scharff, and T. Braun, *J. Mol. Liq.*, **105**, Nos. 2–3: 141 (2003); [https://doi.org/10.1016/S0167-7322\(03\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7322(03)00044-8)
22. P. Scharff, L. Carta-Abelmann, C. Siegmund, O. P. Matyshevska, S. V. Prylutska, T. V. Koval, A. A. Golub, V. M. Yashchuk, K. M. Kushnir, and Yu. I. Prylutsky, *Carbon*, **42**, Nos. 5–6: 1199 (2004).
23. Yu. Prilutski, S. Durov, L. Bulavin, V. Pogorelov, Yu. Astashkin, V. Yashchuk, T. Ogul'chansky, E. Buzaneva, and G. Andrievsky, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **324**, No. 1: 65 (1998); <https://doi.org/10.1080/10587259808047135>
24. N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S. R. Wilson, and F. Moussa, *Nano Lett.*, **5**, No. 12: 2578 (2005); doi:10.1021/nl051866b
25. S. V. Prylutska, A. G. Grebinyk, O. V. Lynchak, I. V. Byelinska, V. V. Cherepanov, E. Tauscher, O. P. Matyshevska, Yu. I. Prylutsky, V. K. Rybalchenko, U. Ritter, and M. Frohme, *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.*, **27**, No. 9: 715 (2019); doi:10.1080/1536383X.2019.1634055
26. K. I. Bohuts'ka, Yu. I. Pryluts'kyi, and D. M. Nozdrenko, *Fiziol. Zh.*, **60**, No. 1: 91 (2014).
27. D. Nozdrenko, T. Matvienko, O. Vygovska, V. Soroca, K. Bogutska, A. Zholos, P. Scharff, U. Ritter, and Y. Prylutsky, *Appl. Nanosci.* (2021); doi:10.1007/s13204-021-01703-z
28. G. Didenko, S. Prylutska, Y. Kichmarenko, G. Potebnya, Y. Prylutsky, N. Slobodyanik, U. Ritter, and P. Scharff, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.*, **44**, Nos. 2–3: 124 (2013); doi:10.1002/mawe.201300082
29. Yu. I. Prylutsky, I. V. Vereshchaka, A. V. Maznychenko, N. V. Bulgakova, O. O. Gonchar, O. A. Kyzyma, U. Ritter, P. Scharff, T. Tomiak, D. M. Nozdrenko, I. V. Mischenko, and A. I. Kostyukov, *J. Nanobiotechnology*, **15**, No. 1: 8 (2017); doi:10.1186/s12951-016-0246-1
30. H. Kuznietsova, O. Lynchak, N. Dziubenko, T. Herheliuk, Yu. Prylutsky, V. Rybalchenko, and U. Ritter, *BioImpacts*, **9**, No. 4: 227 (2019); doi:10.15171/bi.2019.28

Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64, Volodymyrska Str.,
UA-01601 Kyiv, Ukraine

¹ Fig. 1. Curves of generation of *muscle soleus* contraction force of rats caused by non-relaxation electrical stimulation with a frequency of 1 and 2 Hz and a duration of 3600 s: mechanograms of muscles in control (a); mechanograms of muscles with therapeutic administration of C₆₀ fullerenes (б); Δt₅₀—time to reduce the maximum contraction force to 50% of the initial level; S₁ and S₂—the integrated muscle power for the entire period of stimulation with a frequency of 1 and 2 Hz, respectively.

² Fig. 2. Dynamic contraction parameters of rat muscle soleus caused by non-relaxation electrical stimulation with a frequency of 1 and 2 Hz and duration of 3600 s: change in the integrated muscle power (a); change in the time to reach 50% of the level of maximum muscle contraction force (б). *p < 0.05, **p < 0.05 compared to control.