Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології
Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii
2023, т. 21, № 3, сс. 665–673

© 2023 ІМФ (Інститут металофізики
ім. Г. В. Курдюмова НАН України)
Надруковано в Україні.

PACS numbers: 81.05.ub, 82.39.Rt, 83.80.Lz, 87.19.Ff, 87.19.R-, 87.85.jc, 87.85.Rs

Вплив C_{60}-фуллеренів на механокінетику втоми скелетних м'язів щурів за введення фракції пептидів з плазми крові пацієнтів із кардіоемболічним ішемічним інсультом

Т. І. Галенова, Н. Г. Ракша, Т. Б. Вовк, К. І. Богуцька, О. М. Савчук, Ю. І. Прилуцький

Київський національній університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13,
01601 Київ, Україна

Досліджено вплив фракції пептидів (до 5 кДа), одержаних з плазми крові хворих на кардіоемболічний ішемічний інсульт під час гострої фази, на динаміку скорочення скелетних м'язів щурів на тлі антиоксидантної дії C_{60}-фуллеренів. Виявлено комплексний потенційний терапевтичний ефект на розвиток м'язової втоми; зокрема, має місце значне зменшення часу виникнення втоми у м'язі, збільшення його інтеґрованої потужности та максимально можливого рівня ґенерації силового зусилля порівняно з контролем, що може сприяти поліпшенню наявних методик лікування м'язових дисфункцій, а також реабілітаційних процедур.

The influence of a fraction of peptides (up to 5 kDa) obtained from the blood plasma of patients with cardioembolic ischemic stroke during the acute phase on the dynamics of skeletal muscle contraction in rats against the background of the antioxidant effect of C_{60} fullerenes is investigated. A complex potential therapeutic effect on the development of muscle fatigue is revealed; in particular, there are a significant reduction in the time of onset of muscle fatigue, an increase in its integrated power and the maximum possible level of force generation compared to the control that can contribute to the improvement of existing methods of treatment of muscle dysfunctions, as well as rehabilitation procedures.

Ключові слова: скелетний м'яз, динаміка м'язового скорочення, втома, C_{60}-фуллерен, фракція пептидів плазми крові пацієнтів з кардіоемболічним ішемічним інсультом.

Key words: skeletal muscle, muscle contraction dynamics, fatigue, C_{60} fullerene, blood-plasma peptide fraction of patients with cardioembolic ischemic stroke.

(Отримано 26 травня 2023 р.)

1. ВСТУП

Ішемічний інсульт головного мозку — необоротня зміна у функціонуванні мозку, що виникає внаслідок значного пониження чи то повного припинення мозкового кровопостачання. Порушення кровопостачання може бути зумовлено різними чинниками; тому класифікація ішемічного інсульту відбувається на підставі даних про його походження та клінічні прояви. Інсульт займає одне з «перших місць» за смертністю пацієнтів від неінфекційних хвороб [1, 2]. Так, на кардіемболічний інсульт (КІ — закупорка судини емболом (тромбом), який потрапив у головний мозок із серця) припадає близько 25% від усіх ішемічних інсультів [3].

Це захворювання часто супроводжується рецидивами та більш тяжким перебігом, аніж атеротромботичний інсульт (коли судина перекривається атеросклеротичною бляшкою чи то тромбом, який від неї відірвався) [4, 5]. Тяжкі стани зумовлено тим, що патогенез цього захворювання включає закупорку судин мозку емболом та оклюзію великих судин мозку [6, 7]. До чинників ризику можна також віднести миготливу аритмію, гострий інфаркт міокарда, патології клапанів серця тощо [8]. Запальний процес супроводжується вивільненням у кров'яне русло різних білків і пептидів, здатних впливати на м'язову функцію [7]. Ішемічний каскад запускається на ділянці пів тіні — ділянці з обмеженим кровотоком і частково збереженим енергетичним обміном, що знаходиться між ішемічним ядром і неушкодженою тканиною. Гіпоперфузія призводить до «збою» продукування АТФ у клітинах мозку, що викликає дисфункцію енергозалежних йонних транспортних насосів. Внаслідок цього активуються Ca^{2+}-канали, а збудливі нейромедіятори вивільняються у позаклітинний простір; також індукується транспорт глутамату з деполяризованих астроцитів [5].

Пониження доступу кисню веде до анаеробного гліколізу та накопичення лактату. Внаслідок цих процесів розвивається ексайтотоксичність. У подальшому ініціюється ґенерація вільних радикалів (супероксиду, оксиду Нітроґену та гідроксильного радикалу) й активуються деґрадаційні ферменти, що призводить до окислювального стресу та, зрештою, некрозу й апоптозу [3]. Вільні радикали здатні проникати через клітинні мембрани, що спричинює вивільнення йонів Ca^{2+} з внутрішньоклітинних запасів, перекисне окиснення ліпідів і порушення функції мітохондрій [9, 10]. Пошкодження ендотелію та взаємодія оксиду Нітроґену із супероксидом змінює реактивність судин до CO_2, викли-

каючи таким чином вазоконстрикцію, та здатне посилити ішемічне ураження. Також вільні радикали підвищують аґреґацію тромбоцитів.

У літературі описано специфічні біомаркери, які уможливлюють розрізнити вид ішемічних інсультів [11]. Для кожного виду інсульту характерна певна послідовність розвитку симптомів і супутня патологія, однак результат є подібним — формування ділянки інфаркту головного мозку [8]. Клінічні дослідження показують, що у хворих, які перенесли атеротромботичний інсульт або КІ, ризик виникнення геморагічного інсульту (крововиливи у речовину головного мозку, що зумовлено розривом патологічно змінених стінок церебральних судин) у вісім разів вищий [4, 5]. Дослідження виявили присутність у плазмі крові пацієнтів, які перенесли інсульт, фракції пептидів (до 5 кДа), що відрізняється за складом від фракцій пептидів, узятих у здорових пацієнтів. Є низка непрямих доказів того, що ця фракція пептидів присутня у пацієнтів, які одужали, кілька років і здатна збільшувати рівень тонусу м'язів, що може бути ключовим чинником ініціяції геморагічного інсульту [12].

Важливо зазначити, що наразі жоден медичний препарат не здатний захистити нервові клітини або повернути до життєздатности ті, що загинули під час інсульту. Враховуючи, що завдяки нанорозміру водорозчинні C_{60}-фуллерени здатні проникати через мембрану клітин, за низьких доз не спричиняють токсичного впливу на організм, справляють нейропротекторну та потужну антиоксидантну дії [13–15] і, нарешті, сприяють поліпшенню механокінетичних властивостей ішемізованих скелетних м'язів [16, 17], метою цієї роботи було з'ясувати вплив фракції пептидів (до 5 кДа), одержаних з плазми крові хворих на КІ під час гострої фази, на динаміку скорочення скелетних м'язів щурів на тлі антиоксидантної дії C_{60}-фуллеренів.

2. МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Збір зразків плазми крові. Зразки плазми крові було взято у 35 здорових суб'єктів і 56 пацієнтів з КІ (хворих було госпіталізовано у неврологічне відділення лікарні №4, м. Київ). Через рік після інсульту ті ж пацієнти були запрошені для участі у подальшому дослідженні. Пацієнти або їхні родичі надали письмову згоду на участь у такому дослідженні. Дизайн дослідження схвалено біоетичним комітетом ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Зразки плазми крові було приготовлено шляхом збору крові у вакуумні пробірки, що містили 3,8% цитрату Натрію.

Одержання пептидного пулу. Пул пептидів одержували відповід-

но до методу [18]. Плазму крові змішували з 1,2 М $HClO_4$ у співвідношенні 1:1 (об./об.) для осадження білків. Після центрифуґування із 10000*g* упродовж 20 хв. за температури у 4°С супернатант нейтралізували 5 М КОН до pH 7,0. Після додавання етанолу до кінцевої концентрації у 80% зразок витримували за температури у 4°С упродовж 30 хв. і центрифуґували. Концентрацію пептидів визначали за допомогою спектрофотометра Smart SpecTMPlus (BioRad, США) за 210 нм, розраховуючи з використанням калібрувальної кривої (як стандарт використали криву, одержану з дипептидом CBZ-гліцил-гліцин 0,26 кДа). Молекулярна маса одержаних пептидів — до 5 кДа. Вихідна концентрація пептидів у кожному зразку становила 1 мг/мл.

Біомеханічні дослідження. Експерименти виконували згідно з правилами поводження з піддослідними тваринами, затвердженими біоетичним комітетом ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка відповідно до правил «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях», і норм біомедичної етики відповідно до Закону України №3447-IV 21.02.2006 р., м. Київ «Про захист тварин від жорстокого поводження» з проведення медико-біологічних досліджень.

Досліди проводили на білих нелінійних щурах масою у 135–140 г. Анестезію тварин здійснювали внутрішньочеревинним введенням нембуталу (40 мг/кг). Камбалоподібний м'яз щура (*muscle soleus*) звільняли від оточувальних тканин; у дистальній частині перерізали його сухожильну частину. Для підготовки до модульованої стимуляції еферентів перерізали вентральні корінці безпосередньо в місцях їхнього виходу зі спинного мозку. Зміну сили м'язового скорочення реєстрували за допомогою тензодатчиків, до яких приєднували сухожилки досліджуваного м'яза [19]. Для формування стимулювальних сиґналів використовували програмовані ґенератори сиґналів спеціяльної форми. Розподілена стимуляція давала змогу одержувати монотонне й однорідне скорочення м'яза за стимуляції окремих філаментів. Стимуляцію здійснювали електричними імпульсами тривалістю у 2 мс через платинові електроди. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз проводили за допомогою системи механостимуляторів [20]. Збурення навантаження здійснювали лінійним електромагнетним двигуном.

Методика одержання водного розчину C_{60}-фуллеренів (C_{60}ФВР). Для одержання C_{60}ФВР був застосований метод, який ґрунтується на переведенні молекул C_{60}-фуллерену з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком [21, 22]. Для цього змішували насичений розчин чистого C_{60}-фуллерену в толуолі (чистота

$> 99{,}5\%$), де його концентрація відповідає максимальній розчинності у $\cong 2{,}9$ мг/мл, та однаковий об'єм дистиляту у відкритому стакані. Дві утворені водні фази піддавали дії ультразвуку. Процедуру виконували до повного випаровування толуолу та набуття водною фазою жовтого забарвлення. Фільтрацією водного розчину відділяли потрібний продукт від нерозчиненого C_{60}-фуллерену. За допомогою цього методу вдається одержати різні його концентрації у воді — від 0,01 до 1,5 мг/мл.

Методика введення пептидів і C_{60}ФВР. Пептиди КІ (до 5 кДа) вводили внутрішньовенно за 2 год до початку експерименту дозою у 0,1 мг/кг ваги тварини ($n = 7$). Контрольним тваринам ($n = 7$) вводили пептиди, взяті з крові здорових донорів, за тієї ж дози. Одразу варто зазначити, що у цьому випадку не виявлено жодних змін у механокінетичних відповідях м'яза.

C_{60}ФВР вводили внутрішньочеревинно дозою у 1 мг/кг ваги тварини ($n = 7$) через 1 год після введення пептидів КІ. Вибрана доза введення ґрунтується на експериментально встановлених даних, що свідчать про високу протекторну дію водорозчинних C_{60}-фуллеренів на моделю ішемії-реперфузії [23, 24]. Варто також зазначити, що використана доза була значно нижчою за значення LD_{50}, яка за перорального введення щурам становила 600 мг/кг маси тварини [25].

Статистичні дослідження. Статистичну обробку результатів вимірювання проводили методами варіяційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 8.0. Відмінності між експериментальними групами було виявлено за допомогою t-тесту. Значення $p < 0{,}05$ вважалися значущими.

3. РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Застосування 1 Гц-електростимуляції упродовж 1800 с (рис. 1) призводило до швидкого розвитку втоми м'яза (більш ніж удвічі порівняно з контролем) у групі щурів, що отримали ін'єкції пептидів КІ. Застосування ін'єкцій C_{60}-фуллерену стабілізувало силову відповідь м'яза, яка склала $21 \pm 2\%$ від контрольних значень.

Інтеґрована потужність м'яза (розрахована площа під силовою кривою як показник загальної працездатности м'яза за застосованих стимуляційних пулів; рис. 2), час зменшення силової відповіді на 50% і 25% від контрольних значень (рис. 1), максимальна та мінімальна сили скорочення м'яза упродовж стимуляції виявили аналогічну тенденцію.

Так, за введення фракції пептидів КІ величина інтеґрованої потужности м'яза знизилася на $48 \pm 2\%$ і склала $62 \pm 2\%$ від контрольних значень. Введення C_{60}-фуллеренів наблизило цей пока-

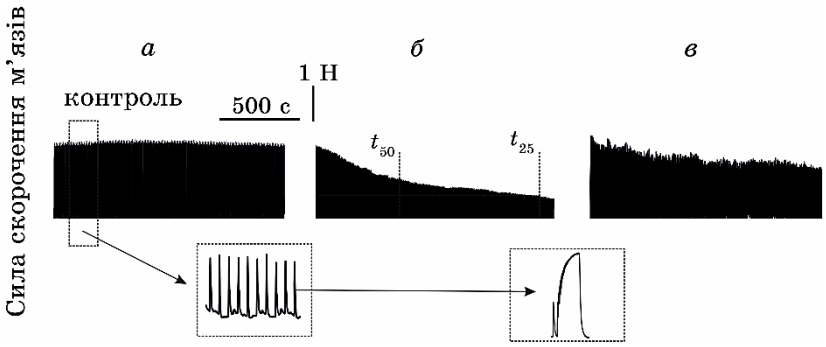

Рис. 1. Реєстрація сили скорочення *muscle soleus* щурів із застосуванням 1 Гц-електростимуляції тривалістю у 1800 с: *а* — механограми скорочення *muscle soleus* (контрольні значення); *б* — введення фракції пептидів КІ (до 5 кДа); *в* — введення пептидів КІ (до 5 кДа) + C_{60}-фуллерен. t_{50} і t_{25} — часи зменшення силової відповіді на 50% і 25% відповідно від контрольних значень.[1]

зник майже до контрольних значень (відмінність не перевищувала $12 \pm 1\%$). Час зменшення силової відповіді на 50% і 25% від контрольних значень за введення фракції пептидів КІ склав $25 \pm 1\%$ і $87 \pm 3\%$ відповідно. За введення C_{60}-фуллеренів м'язова сила не понижувалася на 50% від контрольних значень упродовж усього експерименту (рис. 2).

За введення фракції пептидів КІ максимальна (f_{max}) і мінімальна (f_{min}) сили скорочення м'яза упродовж електростимуляції склали $43 \pm 5\%$ і $13 \pm 3\%$ відповідно від контрольних значень. Дія водорозчинних C_{60}-фуллеренів додатково скоригувала ці показники до $86 \pm 7\%$ і $81 \pm 5\%$ відповідно (рис. 2).

Таким чином, ін'єкції фракції пептидів КІ значно зменшували час виникнення втоми у м'язі, його інтеґровану потужність і максимально можливий рівень ґенерації силового зусилля порівняно з контролем. Терапевтичне застосування ін'єкцій C_{60}-фуллерену додатково зменшувало рівень розвитку м'язової втоми.

4. ВИСНОВКИ

На підставі одержаних результатів можна зробити висновок про те, що ін'єкції фракції пептидів (до 5 кДа), взятих у пацієнтів у період гострої фази КІ, змінюють параметри механограм м'язової втоми, зменшуючи патологічні дисфункції скелетних м'язів. Терапевтичне застосування ін'єкцій C_{60}-фуллерену у комбінації з фракцією пептидів КІ додатково зменшує рівень описаних пато-

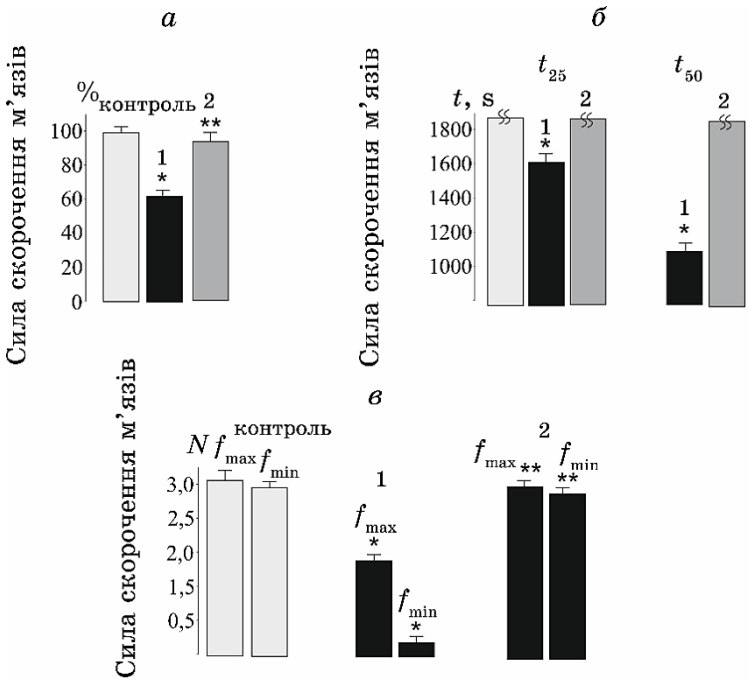

Рис. 2. Біомеханічні параметри скорочення *muscle soleus* щурів із застосуванням 1 Гц-стимуляції тривалістю у 1800 с: *а* — інтеґрована потужність м'яза, представлена у відсотках від контрольного значення, прийнятого за 100%; *б* — часи зменшення силової відповіді на 50% (t_{50}) і 25% (t_{25}) від контрольних значень; *в* — максимальна (f_{max}) і мінімальна (f_{min}) сили скорочення м'яза упродовж електростимуляції; контроль — контрольні механограми скорочення *muscle soleus*; 1 — введення фракції пептидів КІ (до 5 кДа); 2 — введення пептидів КІ (до 5 кДа) + C_{60}-фуллерен; $^{*}p$ — $< 0{,}05$ щодо групи control; ** — $p < 0{,}05$ щодо групи 1.[2]

логій. Це відкриває перспективу щодо проведення подальших клінічних випробувань водорозчинних C_{60}-фуллеренів у комплексі з фракцією пептидів КІ як потенційних терапевтичних засобів, здатних коригувати патологічні стани м'язової системи.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА–REFERENCES

1. V. L. Feigin, M. H. Forouzanfar, and R. Krishnamurthi et al., *Lancet*, **383**, No. 9913: 245 (2014); doi:10.1016/s0140-6736(13)61953-4
2. S. S. Virani, A. Alonso, and H. J. Aparicio et al., *Circulation*, **143**, No. 8: e254 (2021); doi:10.1161/CIR.0000000000000950
3. J. Diaz Guzman, *Neurologia*, **1**: 4 (2012); doi:10.1016/S0213-4853(12)70002-6
4. J. M. Ferro, *Lancet. Neurol.*, **2**, No. 3: 177 (2003); doi:10.1016/s1474-

4422(03)00324-7
5. A. Arboix and J. Alioc, *Curr. Cardiol. Rev.*, **6**, No. 3: 150 (2010); doi:10.2174/157340310791658730
6. W. Zhu, L. Churilov, B. C. V. Campbell, M. Lin, X. Liu, S. M. Davis, and B. Yanet, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **23**, No. 10: 2888 (2014); doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.07.018
7. H. Kamel and J. S. Healey, *Circ. Res.*, **120**, No. 3: 514 (2017); doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308407
8. C. D. Maida, R. L. Norrito, M. Daidone, A. Tuttolomondo, and A. Pinto, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, No. 18: 6454 (2020); doi:10.3390/ijms21186454
9. T. Ivanics, Z. Miklys, Z. Ruttner, S. Bátkai, D. W. Slaaf, R. S. Reneman, A. Tyth, and L. Ligeti, *Pflügers Arch.*, **440**, No. 2: 302 (2000); doi:10.1007/s004240051052
10. H. Amani, R. Habibey, S. J. Hajmiresmail, S. Latifi, H. Pazoki-Toroudi, and O. Akhavan, *J. Mater. Chem. B*, **5**, Iss. 48: 9452 (2017); https://doi.org/10.1039/C7TB01689A
11. R. S. Foote, J. D. Pearlman, A. H. Siegel, and K. T. Yeo, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **44**, No. 10: 1980 (2004); doi:10.1016/j.jacc.2004.08.045
12. A. S. Maisel, P. Krishnaswamy, and R. M. Nowak et al., *New Engl. J. Med.*, **347**, No. 3: 161 (2002); doi:10.1056/NEJMoa020233
13. L. L. Dugan, E. G. Lovett, K. L. Quick, J. Lotharius, T. T. Lin, and K. L. O'Malley, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **7**, No. 3: 243 (2001); doi:10.1016/s1353-8020(00)00064-x
14. S. V. Eswaran, *Curr. Sci.*, **114**: 1846 (2018); doi:10.18520/cs/v114/i09/1846-1850
15. A. Grebinyk, S. Prylutska, S. Grebinyk, Yu. Prylutskyy, U. Ritter, O. Matyshevska, T. Dandekar, and M. Frohme, *Nanoscale Res. Lett.*, **14**, No. 13: 61 (2019); doi:10.1186/s11671-019-2894-1
16. S. Y. Zay, K. I. Bogutska, D. N. Nozdrenko, and Y. I. Prylutskyy, *Fiziol. Zh.*, **62**, No. 3: 66 (2016) (in Ukrainian); https://doi.org/10.15407/fz62.03.066
17. D. M. Nozdrenko, T. Yu. Matvienko, O. V. Vygovska, K. I. Bogutska, O. P. Motuziuk, N. Y. Nurishchenko, Yu. I. Prylutskyy, P. Scharff, and U. Ritter, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, Iss. 13: 6812 (2021); https://doi.org/10.3390/life12030332
18. M. Kozyk, K. Strubchevska, T. Marynenko, A. Zlatska, T. Halenova, N. Raksha, O. Savchuk, T. Falalyeyeva, O. Kovalchuk, and L. Ostapchenko, *Medicina*, **59**, Iss. 2: 238 (2023); https://doi.org/10.3390/medicina59020238
19. D. N. Nozdrenko, S. M. Berehovyi, N. S. Nikitina, L. I. Stepanova, T. V. Beregova, and L. I. Ostapchenko, *Biomed. Res.*, **29**, Iss. 19: 3629 (2018); doi:10.4066/biomedicalresearch.29-18-1055
20. D. N. Nozdrenko and K. I. Bogutska, *Biopolym. Cell.*, **21**, No. 3: 283 (2005); http://dx.doi.org/10.7124/bc.0006F3
21. Yu. I. Prilutski, S. S. Durov, V. N. Yashchuk, T. Yu. Ogul'chansky, V. E. Pogorelov, Yu. A. Astashkin, E. V. Buzaneva, Yu. D. Kirghizov, G. V. Andrievsky, and P. Scharff, *Europ. Phys. J. D*, **9**, Nos. 1–4: 341 (1999).
22. Yu. I. Prylutskyy, V. M. Yashchuk, K. M. Kushnir, A. A. Golub, V. A. Kudrenko, S. V. Prylutska, I. I. Grynyuk, E. V. Buzaneva, P. Scharff,

T. Braun, and O. P. Matyshevska, *Mater. Sci. Engineer. C*, **23**, Nos. 1–2: 109 (2003).
23. D. M. Nozdrenko, D. O. Zavodovsky, T. Yu. Matvienko, S. Yu. Zay, K. I. Bogutska, Yu. I. Prylutskyy, U. Ritter, and P. Scharff, *Nanoscale Res. Lett.*, **12**: 115 (2017); https://doi.org/10.1186/s11671-017-1876-4
24. D. M. Nozdrenko, S. Yu. Zay, O. P. Motuziuk, K. I. Bogutska, A. V. Ilchenko, and Yu. I. Prylutskyy, *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, **16**, No. 3: 585 (2018) (in Ukrainian); https://doi.org/10.15407/nnn.16.03.585
25. N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S. R. Wilson, and F. Moussa, *Nano Lett.*, **5**, No. 12: 2578 (2005); https://doi.org/10.1021/nl051866b

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

[1] **Fig. 1.** Registration of the force of *muscle soleus* contraction in rats, when applying 1 Hz electrical stimulation lasting 1800 s: *а*—mechanograms of *muscle soleus* contraction (control values); *б*—administration of a fraction of KI peptides (up to 5 kDa); *в*—administration of KI peptides (up to 5 kDa) + C_{60} fullerene. t_{50} and t_{25} are the times of reduction of the force response by 50% and 25%, respectively, from the control values.

[2] **Fig. 2.** Biomechanical parameters of *muscle soleus* contraction of rats, when applying 1 Hz stimulation lasting 1800 s: *а*—an integrated muscle power, presented as a percentage of the control value taken as 100%; *б*—the times of reduction of force response by 50% (t_{50}) and 25% (t_{25}) from the control values; *в*—the maximum (f_{max}) and minimum (f_{min}) muscle contraction forces during electrical stimulation; контроль—control mechanograms of *muscle soleus* contraction; 1—administration of a fraction of KI peptides (up to 5 kDa); 2—administration of KI peptides (up to 5 kDa) + C_{60} fullerene; *—$p < 0.05$ compared to the control group; **—$p < 0.05$ relative to group 1.