

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

C₆₀-фуллерен поліпшує нервову провідність після м'язової атрофії

Д. М. Ноздренко¹, О. П. Мотузюк^{1,2}, О. В. Долгополов³,
І. В. Пампуха¹, К. І. Богущька¹, Ю. І. Прилуцький¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13,
01601 Київ, Україна

²Волинський національний університет імені Лесі Українки,
просп. Волі, 13,
43025 Луцьк, Україна

³ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України»,
вул. Бульварно-Кудрявська, 27,
01601 Київ, Україна

Досліджено нервову провідність за стимуляції *muscle soleus* щурів після довготривалого знерухомлення задніх кінцівок, використовуючи клінічний модель — розрив Ахіллового сухожилля. Аналізу механокінетичних параметрів скорочення м'яза проводили на 45 добу після ініціації атрофії. Як терапевтичний наноагент, був використаний водорозчинний C₆₀-фуллерен у щоденній пероральній дозі в 1 мг/кг упродовж експерименту. Затримка в часі початку скорочення м'яза, викликаного 1 Гц- і 2 Гц-стимуляціями, виявила її різке зростання від 98 ± 6 мс у контролі до 443 ± 8 мс і 487 ± 7 мс після ініціації атрофії відповідно. Ця затримка пов'язана з пониженням провідності нервового стимулу внаслідок деструктивних змін у нервовій тканині, викликаних атрофією м'яза. У всіх проведених тестах за терапевтичного введення водорозчинних C₆₀-фуллеренів фіксували збільшення нервової провідності на $31 \pm 2\%$ і $36 \pm 2\%$ за 1 Гц- і 2 Гц-стимуляцій відповідно щодо групи атрофія. Це свідчить про наявність компенсаторної активації C₆₀-фуллеренами ендогенної антиоксидантної системи у процесі дистрофічних змін, викликаних довготривалим знерухомленням.

Nerve conduction under stimulation of the rat *muscle soleus* after long-term immobilisation of the hind limbs is studied using a clinical model—the rupture of the Achilles tendon. The analysis of mechanokinetic parameters of muscle contraction is performed on day 45 after the initiation of atrophy. The water-soluble C₆₀ fullerene is used as a therapeutic nanoagent at a daily oral dose of 1 mg/kg during the experiment. The de-

lay in the time of muscle contraction caused by 1 Hz and 2 Hz stimulations reveals a sharp increase from 98 ± 6 ms in control to 443 ± 8 ms and 487 ± 7 ms after atrophy initiation, respectively. This delay is associated with a decrease in the conductivity of the nerve stimulus due to destructive changes in the nervous tissue caused by muscle atrophy. In all the tests performed with the therapeutic administration of water-soluble C_{60} fullerenes, an increase in nerve conduction by $31 \pm 2\%$ and $36 \pm 2\%$ at 1 Hz and 2 Hz stimulation, respectively, is detected in relation to the atrophy group. This indicates the presence of compensatory activation of the endogenous antioxidant system by C_{60} fullerenes in the process of dystrophic changes caused by prolonged immobilisation.

Ключові слова: *muscle soleus*, м'язова атрофія, механокінетика скорочення м'яза, C_{60} -фуллерен.

Key words: *muscle soleus*, muscle atrophy, mechanokinetics of muscle contraction, C_{60} fullerene.

(Отримано 29 січня 2024 р.)

1. ВСТУП

М'язова атрофія — зменшення м'язової маси, що призводить до часткової або повної втрати функції м'яза [1]. Володіючи вираженою пластичністю, скелетний м'яз здатний перебудовувати свій структурно-метаболічний профіль залежно від характеру скорочувальної активності та зміни зовнішніх умов [2]. Регулярні силові тренування здатні значно посилювати інтенсивність синтезу білків і, як наслідок, призводити до гіпертрофії м'язових волокон [3]. І навпаки, функціональне розвантаження веде до пригнічення синтезу білків та активації протеолізи, що виражається у зменшенні діаметра м'язових волокон і втраті їхньої сили [4]. Встановлено, що багато фізіопатологічних станів можуть викликати пониження м'язової маси [5], зокрема отруєння [6, 7] й ішемічні пошкодження [8]; однак молекулярні механізми цього процесу до кінця не з'ясовано [9, 10].

Є багато супутніх патологій, що виникають за м'язової атрофії, зокрема деградація нервових структур, відповідальних за активацію атрофованих м'язів [11]. Пошкодження периферичних нервів, спричинене атрофією, може призвести до часткової або повної втрати сенсорних, рухових і вегетативних функцій, а також до невропатичного болю [12]. Функціональне відновлення роботи м'язів після довготривалої атрофії без регенерації та відновлення роботи відповідних нервових сполучень і периферичних нервів не відповідає суті проведення оптимальних терапевтичних заходів. Виникає так зване замкнене коло, розірвати яке можливо лише за одночас-

ної терапії м'язової та нервової тканин [13, 14]. Загалом основна маса лікувальних препаратів протидіє гіпералгетичній симптоматиці невропатій, але не впливає на перебіг цих захворювань. Про нейропротекторні та нейровідновні ефекти, спричинені фармакологічним лікуванням, повідомлялося лише зрідка [15].

Однією з основних причин пошкодження периферичних нервів за атрофії є підвищення оксидативного стресу [16]. Активні форми кисню (АФК) беруть участь за розвитку станів постійного болю, що виникають внаслідок пошкодження нервів або запальних явищ [17]. Дослідження [18] показали, що антиоксиданти є ефективними для полегшення гіпералгезії у невропатичних щурів з перев'язаними спинномозковими нервами та вторинної механічної гіпералгезії, викликаній капсаїцином у щурів і мишей. Усе більше даних підтверджує думку, що саме АФК є головним патогенетичним чинником розвитку та підтримки стійкого невропатичного болю [19]. Результати [20, 21] свідчать, що антиоксидантна терапія пригнічує порушення синтези і деградацію білка за атрофії скелетних м'язів. У наших попередніх роботах на моделях *in vivo* показано, що введення водорозчинних C₆₀-фуллеренів після ініціацій м'язової ішемії [22] та механічної травми [23], м'язових дисфункцій, пов'язаних з отруєнням пестицидами [24] та розвитком атрофічних процесів [25], істотно поліпшувало динаміку скорочення м'яза.

Відтак, метою цієї роботи було оцінити здатність C₆₀-фуллерену як потужного антиоксиданту [26] поліпшити регенерацію нервової тканини за розвитку атрофії, пов'язаної з ахіллотомією.

2. МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Для одержання водного розчину C₆₀-фуллеренів був застосований метод, який ґрунтується на переведенні молекул C₆₀ з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком [27]. Одержаний водний розчин C₆₀-фуллеренів за максимальної концентрації у 0,15 мг/мл є типовим наноколоїдом [28], який залишається стабільним упродовж 12–18 місяців за температури у +4–+25°C.

Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Wistar віком у 1–3 місяці вагою у 200 ± 6 г. Протокол дослідження був затверджений комісією з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно з правилами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» і норм біомедичної етики згідно із Законом України №3447–IV від 21.02.2006 р. (м. Київ) «Про захист тварин від жорстокого поводження» під час проведення медико-біологічних досліджень.

Перед початком досліджень щури піддавалися ахіллотомії — перерізу Ахіллового сухожилля [25]. Досліджували 3 експериментальні групи тварин ($n = 7$ у кожній групі): контроль, атрофія (після 45 діб атрофії) й атрофія + C_{60} (після 45 діб атрофії за щоденного перорального введення водного розчину C_{60} -фуллеренів). Важливо зазначити, що дозу водорозчинних C_{60} -фуллеренів 1 мг/кг було обрано як найбільш оптимальну для вивчення їхньої антиоксидантної дії на інших моделях м'язової патології [22–25]. Крім того, вона є значно нижчою за значення LD_{50} , яке становило 600 мг/кг за перорального введення щурам [29].

Анестезію тварин здійснювали внутрішньоочеревинним введенням нембуталу (40 мг/кг). Дослідження динамічних властивостей м'язового скорочення проводили за активації м'яза з використанням методу модульованої стимуляції еферентів [30]. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів.

Силу скорочення м'яза вимірювали за допомогою тензодатчиків [22–25].

Статистичну аналізу результатів проводили методами варіаційної статистики у програмі Statistica 8.0. Кожна з одержаних експериментальних механокінетичних кривих є результатом усереднення 10 аналогічних мірянь. Для оцінки достовірності виявлених змін застосовували дисперсійну аналізу ANOVA з наступним тестом множинного порівняння за Бонферроні. Значення $p < 0,05$ вважалися значущими.

3. РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Використання високочастотних стимуляційних пулів здатне понизити шкідливий вплив м'язового розвантаження на камбалоподібний (*muscle soleus*) і литковий м'язи. Крім того, поєднання високочастотних і низькочастотних стимулів під час розвантаження є більш ефективним у запобіганні атрофії м'язів камбалоподібного м'яза та збереженні скорочувальної функції литкового м'яза [31]. Виходячи з цього, ми проаналізували зміни у часі початку скорочення *muscle soleus* щурів, викликаного 1 Гц- та 2 Гц-стимуляційними пулами.

На рисунку 1 представлено час початку силової відповіді *muscle soleus* за його стимуляції пулами частотами у 1 Гц і 2 Гц на 45 добу після ініціації атрофії. Істотне зменшення максимальної силової відповіді після атрофії є проявом зменшення кількості активно функціонуючих м'язових волокон [4–6]. Зменшення сили скорочення з підвищенням частоти стимуляції є типовою ознакою розвитку втомлювальних процесів на тлі атрофічних змін у м'язі [5, 25].

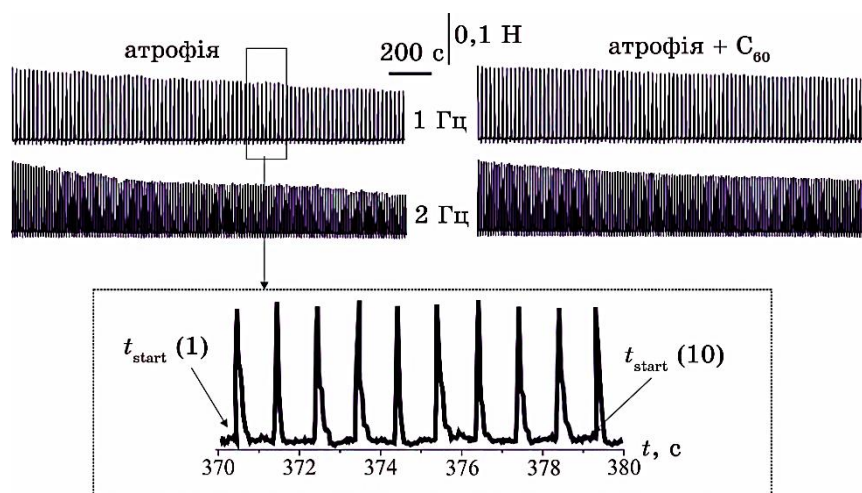


Рис. 1. Сила скорочення *muscle soleus* щура після атрофії за застосування пулів безрелаксаційної 1 Гц- та 2 Гц-стимуляції тривалістю у 1800 с: атрофія й атрофія + C₆₀ — скорочення атрофованого *muscle soleus* без введення C₆₀-фуллерену та на тлі його введення; $t_{\text{start}(1)}$ і $t_{\text{start}(10)}$ — час початку 1-го та 10-го скорочення м'яза відповідно.¹

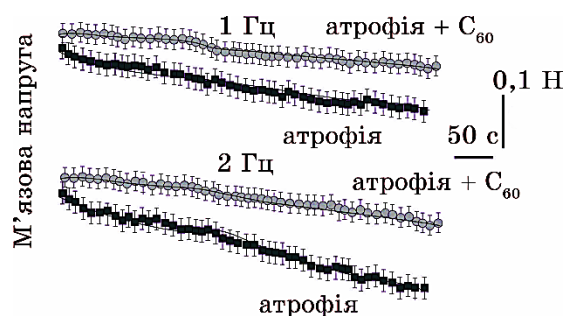


Рис. 2. Зміна максимальної сили скорочення *muscle soleus* щура після атрофії за застосування пулів безрелаксаційної 1 Гц- та 2 Гц-стимуляції тривалістю у 1800 с: атрофія й атрофія + C₆₀ — скорочення атрофованого *muscle soleus* без введення C₆₀-фуллерену та на тлі його введення; $p < 0,05$.²

Реєстрація 50 послідовних скорочень виявила зменшення максимальної сили скорочення на $21 \pm 1\%$ за 1 Гц-стимуляції та $37 \pm 2\%$ за 2 Гц-стимуляції атрофованого м'яза порівняно з контролем (рис. 2; контроль не представлено). Такі істотні зміни неможливо пояснити лише підвищенням рівня втоми м'яза, оскільки упродовж цього часу цей рівень підвищується усього на $10 \pm 1\%$ [4, 23–25]. Водночас, зменшення максимальної сили та-

кого рівня відбувається за наявності невропатичних пошкоджень або порушень нервової провідності [13, 14, 30].

Фіксація часових затримок початку розвитку м'язової сили під час скорочення, викликаного 1 Гц- та 2 Гц-стимуляціями, виявила її прогресуюче зростання (рис. 3): від 98 ± 6 мс у контролі до 443 ± 8 мс і 487 ± 7 мс відповідно. На нашу думку, ці затримки можуть бути пов'язані з пониженням провідності нервового стимулу внаслідок деструктивних змін у нервовій тканині за розвитку м'язової атрофії [13–15]. Підвищення нервової провідності за використання водного розчину C_{60} -фуллерену до 303 ± 4 мс і 311 ± 3 мс за 1 Гц- та 2 Гц-стимуляції відповідно, тобто на $31 \pm 2\%$ та $36 \pm 2\%$ щодо групи атрофія, свідчить про високу ефективність цього антиоксиданту як чинника зменшення основної причини пошкодження периферичних нервів за атрофії — підвищеного оксидативного стресу [16].

Відмінності реакцій м'яза на зміну частоти стимуляційного впливу за постійної активації вказують на те, що для визначення скорочувальних властивостей м'яза важливо знати не лише поточні значення силової відповіді й інтенсивності активації, але й часові затримки цих біомеханічних параметрів [2, 5, 32]. Зменшення силових показників за невро- або міопатичних порушень можуть бути пов'язані з часовою затримкою виходу із стану «зчеплення» актинових і міозинових міофіламентів під час скорочення м'яза. Важливо зазначити, що за наявності патологічних процесів, пов'язаних з регуляцією м'язового скорочення, ці

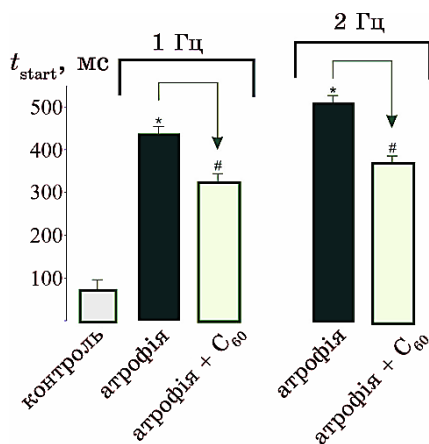


Рис. 3. Час початку скорочення *muscle soleus* щура після атрофії за застосування пулів безрелаксаційної 1 Гц- та 2 Гц-стимуляції тривалістю у 1800 с: атрофія й атрофія + C_{60} — скорочення атрофованого *muscle soleus* без введення C_{60} -фуллерену та на тлі його введення; * $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою атрофія.³

ефекти, насамперед, реагують дисфункцією. Наслідком розвитку таких дисфункцій є необхідність генерування мотонейронами достатньо потужних сигналів для відновлення безпомилкової роботи м'язової системи. Таким чином, за тих самих рівнів стаціонарної фази еферентної команди збільшення тривалості початку процесу поодинокого скорочення не лише уповільнює перехід до нової рівноважної сили, але й приводить до зменшення максимальної силової відповіді.

4. ВИСНОВКИ

Отже, у всіх проведених тестах відбувається збільшення нервової провідності на $31 \pm 2\%$ та $36 \pm 2\%$ через 1 Гц- та 2 Гц-стимуляції відповідно щодо групи атрофія за терапевтичного введення водорозчинних C₆₀-фуллеренів. Це свідчить про наявність компенсаторної активації C₆₀-фуллеренами ендогенної антиоксидантної системи у процесі дистрофічних змін, викликаних довготривалим знерухомленням. Одержані результати підтверджують перспективність застосування водного розчину C₆₀-фуллеренів як терапевтичного наноагента, здатного зменшувати та коригувати патологічні стани м'язової системи, що виникають за атрофії скелетних м'язів внаслідок невикористання їх.

ПОДЯКА

Роботу виконано за підтримки МОН України (проект №24БП018-02).

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. I. Canfora, N. Tarantino, and S. Pierno, *Cells*, **11**, No. 16: 2566 (2022); <https://doi.org/10.3390/cells11162566>
2. D. N. Nozdrenko and K. I. Bogutska, *Biopolym. Cell*, **21**, No. 3: 285 (2005) (in Russian); <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0006F3>
3. I. W. McKinnell and M. A. Rudnicki, *Cell*, **119**, No. 7: 907 (2004); <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.007>
4. Y. Ohira, B. Jiang, R. R. Roy, V. Oganov, E. Ilyina-Kakueva, J. F. Marini, and V. R. Edgerton, *J. Appl. Physiol.*, **73**: 51S (1992); <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.73.2.S51>
5. J. E. Stelzer and J. J. Widrick, *J. Appl. Physiol.*, **95**, No. 6: 2425 (2003); <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01091.2002>
6. K. I. Bohuts'ka, Iu. I. Pryluts'kyi, and D. M. Nozdrenko, *Fiziol Zh.*, **60**, No. 1: 91 (2014) (in Ukrainian).
7. D. N. Nozdrenko, O. M. Abramchuk, V. M. Soroca, and N. S. Miroshnichenko, *Ukr. Biochem. J.*, **87**, No. 5: 38 (2015);

- <https://doi.org/10.15407/ubj87.05.038>
8. 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); (in Ukrainian).
 9. T. Egawa, A. Goto, Y. Ohno, S. Yokoyama, A. Ikuta, M. Suzuki, T. Sugiura, Y. Ohira, T. Yoshioka, T. Hayashi, and K. Goto, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **309**, No. 7: E651 (2015); <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00165.2015>
 10. S. M. Ebert, A. Al-Zougbi, S. C. Bodine, and C. M. Adams, *Physiology (Bethesda)*, **34**, No. 4: 232 (2019); <https://doi.org/10.1152/physiol.00003.2019>
 11. S. Ventadour and D. Attaix, *Curr. Opin. Rheumatol.*, **18**, No. 6: 631 (2006); <https://doi.org/10.1097/01.bor.0000245731.25383.de>
 12. L. Kong, X. Gao, Y. Qian, W. Sun, Z. You, and C. Fan, *Theranostics*, **12**, No. 11: 4993 (2022); <https://doi.org/10.7150/thno.74571>
 13. D. Schaakxs, D. F. Kalbermatten, W. Raffoul, M. Wiberg, and P. J. Kingham, *Muscle Nerve*, **47**, No. 5: 691 (2013); <https://doi.org/10.1002/mus.23662>
 14. L. M. Marquardt and S. E. Sakiyama-Elbert, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24**, No. 5: 887 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.006>
 15. L. Di Cesare Mannelli, C. Ghelardini, A. Toscano, A. Pacini, and A. Bartolini, *Neuroscience*, **165**, No. 4: 1345 (2010); <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.021>
 16. D. Tomassoni, F. Amenta, L. Di Cesare Mannelli, C. Ghelardini, I. E. Nwankwo, A. Pacini, and S. K. Tayebati, *Biomed. Res. Int.*, **2013**: 985093 (2013); <https://doi.org/10.1155/2013/985093>
 17. X. Gao, H. K. Kim, J. M. Chung, and K. Chung, *Pain*, **131**, No. 3: 262 (2007); <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.01.011>
 18. H. K. Kim, J. H. Kim, X. Gao, J.-L. Zhou, I. Lee, K. Chung, and J. M. Chung, *Pain*, **122**, No. 1: 53 (2006); <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.01.013>
 19. J. Yowtak, K. Y. Lee, H. Y. Kim, J. Wang, H. K. Kim, K. Chung, and J. M. Chung, *Pain*, **152**, No. 4: 844 (2011); <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.034>
 20. M. A. Pellegrino, J.-F. Desaphy, L. Brocca, S. Pierno, D. C. Camerino, and R. Bottinelli, *J. Physiol.*, **589**, Pt. 9: 2147 (2011); <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203232>
 21. B. Tastekin, A. Pelit, T. Sapmaz, A. Celenk, M. Majeed, L. Mundkur, and K. Nagabhushanam, *J. Diabetes Res.*, **2023**: 6657869 (2023); <https://doi.org/10.1155/2023/6657869>
 22. D. M. Nozdrenko, K. I. Bogutska, Yu. I. Prylutsky, V. F. Korolovych, M. P. Evstigneev, U. Ritter, and P. Scharff, *Fiziol. Zh.*, **61**, No. 2: 48 (2015); <https://doi.org/10.15407/fz61.02.048>
 23. 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**, Iss. 1: 205 (2020) (in Russian); <https://doi.org/10.15407/nnn.18.01.205>
 24. D. Nozdrenko, O. Abramchuk, S. Prylutska, O. Vygovska, V. Soroca, K. Bogutska, S. Khrapatyi, Yu. Prylutsky, P. Scharff, and U. Ritter, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, No. 9: 4977 (2021); <https://doi.org/10.3390/ijms22094977>
 25. D. Nozdrenko, S. Prylutska, K. Bogutska, N. Nurishchenko, O. Abramchuk,

- O. Motuziuk, Yu. Prylutsky, P. Scharff, and U. Ritter, *Life (Basel)*, **12**, No. 3: 332 (2022); <https://doi.org/10.3390/life12030332>
26. S. V. Eswaran, *Current Sci.*, **114**, No. 9: 1846 (2018).
 27. S. V. Prylutska, O. P. Matyshevska, I. I. Grynyuk, Yu. I. Prylutsky, U. Ritter, and P. Scharff, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **468**: 265 (2007).
 28. 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**: 65 (1998).
 29. M. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel, H. Szwarc, S. R. Wilson, and F. Moussa, *Nano Letters*, **5**, No. 12: 2578 (2005); <https://doi.org/10.1021/nl051866b>
 30. 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); <https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-18-1055>

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64, Volodymyrska Str.,
UA-01601 Kyiv, Ukraine

²Lesya Ukrainka Volyn National University,
13, Voli Ave.,
UA-43025 Lutsk, Ukraine

³SI 'Institute of Traumatology and Orthopedics, N.A.M.S. of Ukraine',
27, Bulvarno-Kudriavska Str.,
UA-01601 Kyiv, Ukraine

¹ **Fig. 1.** The force of contraction of the rat *muscle soleus* after atrophy, when using pools of relaxation-free 1 Hz and 2 Hz stimulation lasting 1800 s: atrophy and atrophy + C₆₀—contraction of the atrophied *muscle soleus* without the introduction of C₆₀ fullerene and against the background of its introduction; $t_{\text{start}(1)}$ and $t_{\text{start}(10)}$ are the start times of the 1st and 10th contractions of the muscle, respectively.

² **Fig. 2.** Change in the maximum force of contraction of the rat *muscle soleus* after atrophy, when using pools of relaxation-free 1 Hz and 2 Hz stimulation lasting 1800 s: atrophy and atrophy + C₆₀—contraction of the atrophied *muscle soleus* without the introduction of C₆₀ fullerene and against the background of its introduction; $p < 0.05$.

³ **Fig. 3.** The time of the onset of contraction of the rat *muscle soleus* after atrophy, when using 1 Hz and 2 Hz pools of non-relaxation stimulation lasting 1800 s: atrophy and atrophy + C₆₀—contraction of the atrophied *muscle soleus* without the introduction of C₆₀ fullerene and against the background of its introduction; * $p < 0.05$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to the atrophy group.