

PACS numbers: 81.16.Fg, 87.16.dr, 87.19.Ff, 87.19.lt, 87.19.R-, 87.19.xn, 87.85.G-

Вплив водорозчинних C₆₀-фуллеренів на параметри гладкого тетанічного скорочення *muscle gastrocnemius* щурів після нейрогенної атрофії

Д. М. Ноздренко¹, М. С. Ангелов¹, К. І. Богущька¹, І. В. Пампуха¹,
О. Р. Дмитроца², Т. Я. Шевчук², 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

Досліджено біомеханічні параметри скорочення *muscle gastrocnemius* щурів (зокрема, максимальну і мінімальну сили поодинокого скорочення м'яза) після нейрогенної атрофії, викликані перерізанням сідничного нерву. Фіксація їх відбувалася на 30 добу після ініціації травми. Як терапевтичний агент, використано пероральне введення C₆₀-фуллеренів у щоденній дозі 1 мг/кг упродовж експерименту. Детально проаналізовано перехід силової відповіді активного м'яза зі стану зубчастого тетанусу в гладкий, як маркера його дисфункції. Показано, що використання водорозчинних C₆₀-фуллеренів збільшувало максимальну силу поодинокого скорочення *muscle gastrocnemius*, наближаючи її до контролю, та зменшувало мінімальну силу, викликаючи гладке тетанічне скорочення м'яза. Одержані результати вказують на перспективність використання цих вуглецевих наноструктур для відновлення скоротливої активності скелетних м'язів після нейрогенної атрофії.

The biomechanical parameters of the rat *muscle gastrocnemius* contraction (in particular, the maximum and minimum force of a single muscle contraction) are studied after neurogenic atrophy caused by sciatic nerve transection. Their fixation is occurred on the 30th day after the initiation of the injury. As a therapeutic agent, oral administration of C₆₀ fullerenes is used in a daily dose of 1 mg/kg throughout the experiment. The transition of the force response of the active muscle from the state of serrated tetanus to smooth one, as a marker of its dysfunction, is analysed in detail. As shown, the use of water-soluble C₆₀ fullerenes increases the maximum force of a single contraction of the *muscle gastrocnemius*, bringing it closer to the control, and reduces the minimum force, causing smooth

tetanic muscle contraction. The results obtained indicate the prospects of using these carbon nanostructures to recover the contractile activity of skeletal muscles after neurogenic atrophy.

Ключові слова: C₆₀-фуллерен, *muscle gastrocnemius*, нейрогенна атрофія, біомеханічні параметри скорочення скелетного м'яза.

Key words: C₆₀ fullerene, *muscle gastrocnemius*, neurogenic atrophy, biomechanical parameters of skeletal muscle contraction.

(Отримано 5 квітня 2025 р.)

1. ВСТУП

Атрофія м'язів супроводжується стоншенням м'язових волокон і зменшенням їхнього об'єму. Більш того, м'язова тканина частково замінюється сполучною тканиною, яка не здатна скорочуватися [1]. На сьогодні немає ефективного лікування атрофії скелетних м'язів через недостатнє розуміння її молекулярних механізмів. Оздоровча фізкультура залишається найбільш вживаним методом лікування атрофії скелетних м'язів [2].

Однією з найскладніших форм м'язової атрофії є нейрогенна атрофія — пошкодження нейронних еферентних шляхів активації м'яза ЦНС, що призводить до втрати іннервації скелетних м'язів, пониження рухової функції та навантаження на скелетні м'язи [3]. Такі супутні чинники нейрогенної атрофії, як хронічне запалення та пошкодження допоміжних структур м'язів окиснювальним стресом [4], пришвидшують атрофію скелетних м'язів і можуть викликати апоптоз м'язових клітин, відкладення жиру та підвищення жорсткості м'яза до критичних значень [5]. Нейрогенна атрофія скелетних м'язів також пов'язана з багатьма системними дисфункціями, що впливають на відновлення рухової активності у пацієнтів з пошкодженням еферентної іннервації [6]. Дослідження [7] підтвердили важливу роль активних форм кисню (АФК) за розвитку нейрогенної атрофії скелетних м'язів і високий терапевтичний потенціал застосованих антиоксидантів [8–10].

Відомо, що біосумісні C₆₀-фуллерени здатні ефективно захоплювати й інактивувати АФК у системах *in vivo* й *in vitro* [11, 12]. Раніше нами було показано, що застосування водорозчинних C₆₀-фуллеренів за безпечних діючих доз після ініціації ішемічного пошкодження скелетного м'яза [13], його механічної травми [14], ахілотеномії [15] та м'язової дисфункції, пов'язаної з отруєнням пестицидами [16], поліпшує функціонування скелетно-м'язової системи щурів. Таким чином, метою цієї роботи було дослідити вплив водорозчинних C₆₀-фуллеренів на кінетику глад-

кого тетанічного скорочення *muscle gastrocnemius* щурів, як одного з ключових біомеханічних маркерів його дисфункції, після нейрогенної атрофії, викликані пошкодженням сідничного нерва (*nervus ischiadicus*).

2. МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

Для одержання водного розчину C₆₀-фуллерену (C₆₀ФВР) використовували метод, що ґрунтується на перенесенні молекул C₆₀ з толуолу у воду з одночасним обробленням ультразвуком (8 Гц, 8 годин) [17]. Одержаний C₆₀ФВР у максимальній концентрації 0,15 мг/мл зберігає стабільність упродовж 12–18 місяців за температури у +4–25°C. Він є типовим наноколоїдом, що містить як окремі молекули C₆₀, так і їхні наноагрегати [18].

Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Wistar віком у 2 місяці вагою у 170 ± 5 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 21.02.2006 р. (м. Київ) «Про захист тварин від жорстокого поводження» під час проведення медико-біологічних досліджень.

Тварин випадковим чином розподіляли на такі піддослідні групи: контроль ($n = 7$), група «травма» ($n = 7$, перерізування сідничного нерва), група «травма + C₆₀» ($n = 7$, щоденне, упродовж 30 діб експерименту, пероральне застосування C₆₀ФВР у дозі 1 мг/кг маси тіла тварини після ініціації травми).

Анестезію тварин здійснювали внутрішньочеревинним введенням Золетилу (40 мг/кг). Сідничний нерв піддослідних тварин у лівій задній кінцівці був оголений і перерізаний на 10 мм проксимальніше від розгалуження великогомілкового та малогомілкового нервів [19].

Muscle gastrocnemius звільняли від оточувальних тканин; у дистальній частині його сухожильну частину приєднували до тензодатчиків. Для підготовки до модульованої стимуляції еферентів у відповідних сегментах перерізували вентральні корінці безпосередньо в місця їхнього виходу зі спинного мозку. Філаменти перерізаних вентральних корінців закріплювали на стимулювальних електродах і здійснювали циклічний розподіл послідовності стимулів. Стимуляцію еферентів здійснювали електричними імпульсами тривалістю у 2 мс, сформованими за допомогою генератора імпульсів. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів [20].

Аналізуючи механокінетику скорочення м'яза, ми враховували особливості перетворення сегментарної та низхідної його активності за розвитку атрофічної патології. У процесі відновлення м'язової тканини після атрофічного переродження значна інерційність м'язового скорочення вимагає від мотонейронів наявності таких динамічних властивостей, які б змогли компенсувати недостатньо високі швидкісні параметри скорочення м'яза [21]. Таким чином, уповільнення виникнення гладких скорочувальних реакцій (гладкого тетанусу) є одним з ключових біомеханічних маркерів, який вказує на розвиток патології у нервово-м'язовому препараті. Механокінетична аналіза переходу силової відповіді активного м'яза зі стану зубчастого тетанусу в гладкий є важливою для адекватного розуміння прояву його дисфункцій під час генерування сили окремими руховими одиницями [22].

Статистичну аналізу результатів проводили методами варіаційної статистики у програмі Statistica 8.0. Кожна з одержаних експериментальних кривих скорочення *muscle gastrocnemius* є результатом усереднення 10 аналогічних вимірювань. 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

Час досягнення силою м'яза гладкого тетанічного скорочення характеризується високою чутливістю до дії зовнішніх чинників [23]. Цей компонент м'язової динаміки особливо важливий під час контролю скорочення кисті руки, адже патологічні процеси, які виникають у нервовій або м'язовій тканині, зменшують цю величину, що ускладнює можливість точномірної позиціонування суглобу з пошкодженим м'язом [21]. Однак відмінності реакцій м'яза на зміну частоти стимуляційного впливу [22] вказують на те, що для визначення скорочувальних властивостей м'язів важливо знати не лише поточні значення силової відповіді й інтенсивності активації, а й передісторію зміни цих параметрів. Тому для адекватної аналізи патологічних процесів у *muscle gastrocnemius* щурів після 30-добової нейрогенної атрофії нами було проаналізовано кінетику виникнення гладкого тетанічного скорочення м'яза за дотетанічної стимуляції частотами у 15, 20 і 25 Гц.

На рисунку 1 представлено механограми скорочень *muscle gastrocnemius* щура, викликані стимуляційними пулами частотами у 15, 20 і 25 Гц. За стимуляції частотою у 15 Гц максимальна сила поодинокого скорочення (f_{\max}) *muscle gastrocnemius* після 30-добової нейрогенної атрофії майже не відрізнялася від конт-

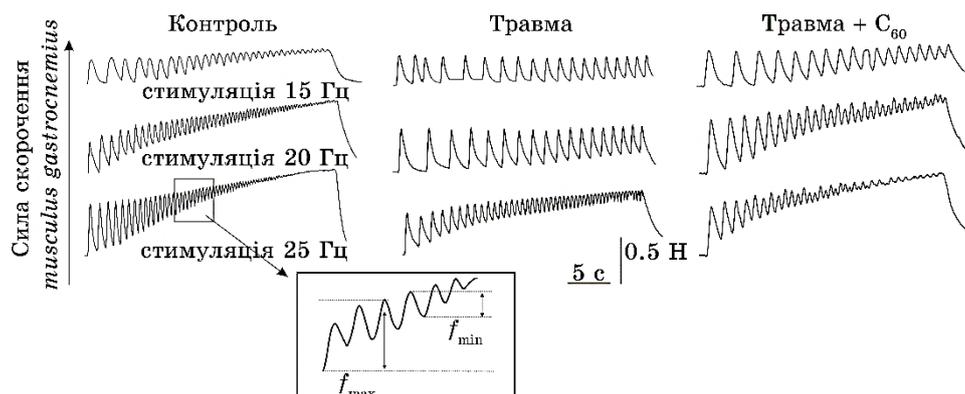


Рис. 1. Механограми скорочень *muscle gastrocnemius* щурів: стимуляція 15, 20 і 25 Гц — скорочення, викликані стимуляційними пулами частотою у 15, 20 і 25 Гц відповідно; групи «травма» і «травма + C₆₀» — сила скорочення *muscle gastrocnemius* через 30 діб після перерізування *nervus ischiadicus* та за введення C₆₀ФВР у щоденній дозі в 1 мг/кг відповідно; f_{\max} — максимальна сила поодинокого скорочення м'яза; f_{\min} — мінімальне значення силової відповіді в одному зубці зубчастого тетанусу (зменшення цього параметра до нульового значення приводить до виникнення гладкого тетанусу); контроль — нативний м'яз.¹

ролю: 56 ± 3 мН проти 58 ± 3 мН. Із збільшенням стимулювальної частоти до 20 Гц максимальна сила поодинокого скорочення у групі «травма» зменшилася до 58 ± 3 мН (у контролі — 63 ± 3 мН). За використання C₆₀ФВР цей показник статистично не відрізнявся від контрольних значень (рис. 2). Підвищення стимулювальної частоти до 25 Гц (частота виникнення гладкого тетанусу) зменшувало максимальну силу поодинокого скорочення *muscle gastrocnemius* у групі «травма» на $17 \pm 1\%$ порівняно з контролем (61 ± 3 мН проти 74 ± 3 мН) і не виводило скорочення у стан гладкого тетанусу. Навпаки, використання C₆₀ФВР збільшувало максимальну силу майже до контролю (71 ± 3 мН) і приводило до виникнення гладкого тетанусу наприкінці стимулювального пулу (рис. 1 і 2).

Зауважимо, що виникнення гладкого тетанусу зумовлено зменшенням (до нульового значення) мінімальної сили у кожному поодинокому скороченні. Зміна саме цього параметра збільшує й час виникнення гладкого тетанічного скорочення та модифікує частотні характеристики еферентних сигналів, необхідних для адекватного функціонування м'язової системи [21]. Через 30 діб після перерізування *nervus ischiadicus* мінімальна сила скорочення за стимуляції частотою у 15 Гц складала 34 ± 2 мН (у контролі — 14 ± 1 мН). Як бачимо, цей параметер зростає майже у

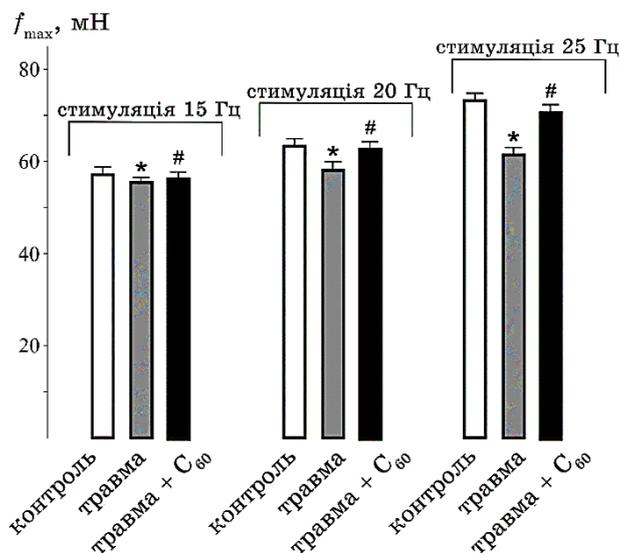


Рис. 2. Зміна максимальної сили поодинокого скорочення (f_{\max}) *muscle gastrocnemius* щурів із застосуванням стимуляційного сигналу частотою у 15, 20 і 25 Гц відповідно: групи «травма» і «травма + C₆₀» — сила скорочення *muscle gastrocnemius* через 30 діб після перерізування *nervus ischiadicus* та за введення C₆₀ФВР у щоденній дозі у 1 мг/кг відповідно; контроль — нативний м'яз; * $p < 0,05$ щодо контрольної групи; # $p < 0,05$ щодо групи «травма».²

2,5 рази (рис. 3). Використання C₆₀ФВР зменшувало його значення на $38 \pm 3\%$ щодо групи «травма», яке склало 21 ± 1 мН. Підвищення стимуляційної частоти до 20 Гц зменшувало мінімальну силу скорочення у контролі до $9,0 \pm 0,5$ мН, а у групі «травма» цей показник склав 24 ± 1 мН (майже 300%-збільшення значення цього параметра). Використання C₆₀ФВР зменшило мінімальну силу майже вдвічі щодо групи «травма» (13 ± 1 мН). Стимуляція частотою у 25 Гц приводила до виникнення гладкого тетанічного скорочення у контролі — мінімальна сила не перевищувала 0,5 мН. У групі «травма» цей показник не знижувався нижче 18 ± 1 мН і не приводив до виникнення гладкого тетанусу (рис. 3). Використання C₆₀ФВР продемонструвало зменшення цього параметра до $4,0 \pm 0,5$ мН, а наприкінці стимуляції спостерігали вихід на гладке тетанічне скорочення (рис. 1, 3).

Значна відмінність у величинах максимальної та мінімальної сил скорочення *muscle gastrocnemius* у групі «травма» може бути пов'язана з нелінійним розвитком зусилля м'яза під час повільних і швидких балістичних рухів. Траєкторія повільного руху *muscle gastrocnemius* повністю визначається його статичними

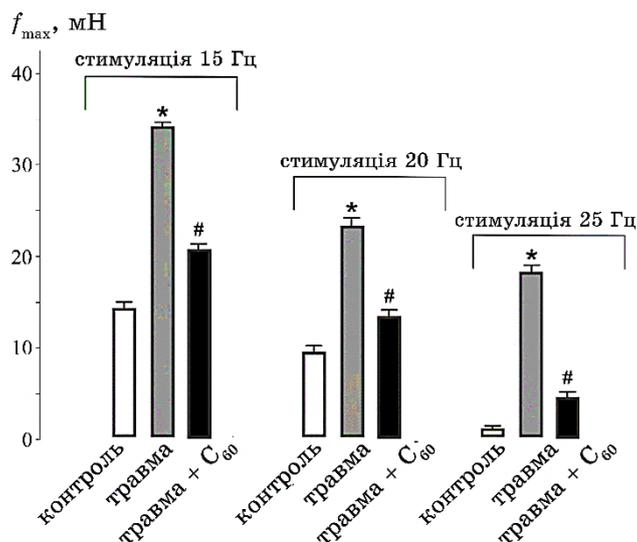


Рис. 3. Зміна мінімальної сили поодинокого скорочення (f_{\min}) *muscle gastrocnemius* щурів під час застосування стимуляційного сигналу частотою у 15, 20 і 25 Гц відповідно: групи «травма» і «травма + C₆₀» — сила скорочення *muscle gastrocnemius* через 30 діб після перерізування *nervus ischiadicus* та за введення C₆₀ФВР у щоденній дозі у 1 мг/кг відповідно; контроль — нативний м'яз; * $p < 0,05$ щодо контрольної групи; # $p < 0,05$ щодо групи «травма».³

властивостями. Якщо ж рух відбувається швидше, тоді слід враховувати динамічні компоненти, які безпосередньо залежать від жорсткості та податливості м'яза, а за атрофічних порушень зазнають значних змін [24]. Збільшення внутрішньом'язових колагенових структур, наявність нефункціональних м'язових волокон, запальні процеси та залучення в осередок пошкодження активованих нейтрофілів, які вивільняють додаткові АФК, змінюють рівень динамічних параметрів скорочення, зокрема збільшують мінімальну силу з переходом скорочення у гладкий тетанічний стан [25].

Таким чином, зафіксована позитивна динаміка зміни досліджуваних біомеханічних параметрів скорочення *muscle gastrocnemius* щурів на тлі нейрогенної атрофії за перорального щоденного введення C₆₀-фуллеренів у дозі 1 мг/кг упродовж експерименту слугує підґрунтям для проведення подальших доклінічних випробувань їх з метою коригування патологічних станів м'язової системи, що виникають за атрофії скелетних м'язів унаслідок невикористання їх.

Дослідження виконано за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України [тема №24БП018-02, 2024–2026].

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА—REFERENCES

1. K. Michael, *Biological Research For Nursing*, **2**, No. 2: 117 (2000); <https://doi.org/10.1177/109980040000200205>
2. L. Yin, N. Li, W. Jia, N. Wang, M. Liang, X. Yang, and G. Du, *Pharmacological Research*, **172**: 105807 (2021); <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105807>
3. M. Midrio, *European Journal of Applied Physiology*, **98**, No. 1: 1 (2006); <https://doi.org/10.1007/s00421-006-0256-z>
4. L. Huang, M. Li, C. Deng, J. Qiu, K. Wang, M. Chang, S. Zhou, Y. Gu, Y. Shen, W. Wang, Z. Huang, and H. Sun, *Antioxidants*, **12**, No. 1: 44 (2022); <https://doi.org/10.3390/antiox12010044>
5. W. Ma, T. Xu, Y. Wang, C. Wu, L. Wang, X. Yang, and H. Sun, *Biotarget*, **2**: 7 (2018); <https://doi.org/10.21037/biotarget.2018.04.01>
6. X. Xu, Z. Talifu, C.-J. Zhang, F. Gao, H. Ke, Y.-Z. Pan, H. Gong, H.-Y. Du, Y. Yu, Y.-L. Jing, L.-J. Du, J.-J. Li, and D.-G. Yang, *Frontiers in Nutrition*, **10**: 1099143 (2023); <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1099143>
7. J. Qiu, Q. Fang, T. Xu, C. Wu, L. Xu, L. Wang, X. Yang, S. Yu, Q. Zhang, F. Ding, and H. Sun, *Frontiers in Nutrition*, **9**: 215 (2018); <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00215>
8. Z. Huang, J. Zhu, W. Ma, and H. Sun, *Biotarget*, **2**: 8 (2018); <https://doi.org/10.21037/biotarget.2018.05.02>
9. Z. Huang, Q. Fang, W. Ma, Q. Zhang, J. Qiu, X. Gu, H. Yang, and H. Sun, *Frontiers in Pharmacology*, **10**: 997 (2019); <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00997>
10. W. Ma, R. Zhang, Z. Huang, Q. Zhang, X. Xie, X. Yang, Q. Zhang, H. Liu, F. Ding, J. Zhu, and H. Sun, *Annals of Translational Medicine*, **7**, No. 18: 440 (2019); <https://doi.org/10.21037/atm.2019.08.101>
11. A. P. Burlaka, E. P. Sidorik, S. V. Prylutska, O. P. Matyshevska, A. A. Golub, Yu. I. Prylutsky, and P. Scharff, *Experimental Oncology*, **26**, No. 4: 326 (2004).
12. S. V. Eswaran, *Current Science*, **114**: 1846 (2018); <https://doi.org/10.18520/cs/v114/i09/1846-1850>
13. D. M. Nozdrenko, K. I. Bogutska, Yu. I. Prylutsky, V. F. Korolovych, M. P. Evstigneev, U. Ritter, and P. Scharff, *Fiziologichnyi Zhurnal*, **61**, No. 2: 48 (2015); <https://doi.org/10.15407/fz61.02.048>
14. D. N. Nozdrenko, T. Yu. Matvienko, O. V. Vygovska, V. M. Soroca, K. I. Bogutska, N. E. Nuryschenko, Yu. I. Prylutsky, and A. V. Zholos, *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*, **18**, Iss. 1: 205 (2020); <https://doi.org/10.15407/nnn.18.01.205>
15. D. Nozdrenko, S. Prylutska, K. Bogutska, N. Y. Nurishchenko, O. Abramchuk, O. Motuziuk, Yu. Prylutsky, P. Scharff, and U. Ritter, *Life*, **12**, No. 3: 332 (2022); <https://doi.org/10.3390/life12030332>
16. D. Nozdrenko, O. Abramchuk, S. Prylutska, O. Vygovska, V. Soroca, K. Bogutska, S. Khrapatyi, Yu. Prylutsky, P. Scharff, and U. Ritter, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, No. 9: 4977 (2021); <https://doi.org/10.3390/ijms22094977>
17. Svitlana Prylutska, Iryna Grynyuk, Tetiana Skaterna, Iryna Horak, Anna Grebinyk, Liudmyla Drobot, Olga Matyshevska, Anton Senenko, Yuriy

- Prylutsky, Anton Naumovets, Uwe Ritter, and Marcus Frohme, *Archives of Toxicology*, **93**, No. 5: 1213 (2019); <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02441-6>
18. Yuriy Prilutski, Sergij Durov, Leonid Bulavin, Valerij Pogorelov, Yuriy Astashkin, Valerij Yashchuk, Tymish Ogul'chansky, Eugenia Buzaneva, and Grygorij Andrievsky, *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, **324**: 65 (1998); <https://doi.org/10.1080/10587259808047135>
 19. H. Saito and L. B. Dahlin, *BMC Neurosci.*, **9**: 88 (2008); <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-88>
 20. D. N. Nozdrenko, S. M. Berehovi, N. S. Nikitina, L. I. Stepanova, T. V. Beregova, and L. I. Ostapchenko, *Biomedical Research*, **29**, No. 19: 3629 (2018); <https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-18-1055>
 21. A. N. Tal'nov, T. Tomiak, A. V. Maznychenko, G. V. Dovgalets, and A. I. Kostyukov, *Neurophysiology*, **46**, No. 3: 212 (2014); <https://doi.org/10.1007/s11062-014-9431-8>
 22. O. V. Vlasenko, V. A. Maisky, A. V. Maznychenko, and A. I. Pilyavskii, *Fiziolohichni Zhurnal*, **54**, No. 1: 45 (2008) (in Ukrainian).
 23. O. M. Khoma, D. A. Zavodovs'kyi, D. N. Nozdrenko, O. V. Dolhopolov, M. S. Miroshnychenko, and O. P. Motuziuk, *Fiziolohichni Zhurnal*, **60**, No. 1: 34 (2014) (in Ukrainian); <https://doi.org/10.15407/fz60.01.034>
 24. S. T. Sicherer, R. S. Venkatarama, and J. M. Grasman, *Bioengineering*, **7**, No. 3: 76 (2020); <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030076>
 25. X. Yang, P. Xue, H. Chen, M. Yuan, Y. Kang, D. Duscher, H.-G. Machens, and Z. Chen, *Theranostics*, **10**, No. 3: 1415 (2020); <https://doi.org/10.7150/thno.40857>

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

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

¹ Fig. 1. Mechanograms of the rat *muscle gastrocnemius* contractions: stimulation of 15, 20 and 25 Hz—contractions caused by stimulation pools with a frequency of 15, 20 and 25 Hz, respectively; 'injury' and 'injury + C₆₀' groups—the force of contraction of the *muscle gastrocnemius* 30 days after transection of the sciatic nerve and with administration of C₆₀ FAS at a daily dose of 1 mg/kg, respectively; f_{max} —maximum force of a single muscle contraction; f_{min} —minimum value of the force response in one prong of serrated tetanus (reducing this parameter to zero results in smooth tetanus); control—native muscle.

² Fig. 2. Change in the maximum force of a single contraction (f_{max}) of the rat *muscle gastrocnemius* when applying a stimulation signal with a frequency of 15, 20 and 25 Hz, respectively: 'injury' and 'injury + C₆₀' groups—the force of contraction of the *muscle gastrocnemius* 30 days after transection of the sciatic nerve and with administration of C₆₀ FAS at a daily dose of 1 mg/kg, respectively; control—native muscle; * $p < 0.05$ relative to the control group; # $p < 0.05$ relative to the 'injury' group.

³ Fig. 3. Change in the minimum force of a single contraction (f_{min}) of the rat *muscle gastrocnemius* when applying a stimulation signal with a frequency of 15, 20 and 25 Hz, respectively: 'injury' and 'injury + C₆₀' groups—the force of contraction of the *muscle gastrocnemius* 30 days after transection of the sciatic nerve and with administration of C₆₀ FAS at a daily dose of 1 mg/kg, respectively; control—native muscle; * $p < 0.05$ relative to the control group; # $p < 0.05$ relative to the 'injury' group.