

Вплив залишкової дії водорозчинного C_{60} -фулерену на скорочення muscle soleus та muscle gastrocnemius щурів за розвитку втоми

Д.М. Ноздренко¹, О.О. Гончар², К.І. Богуцька¹, М.М. Охромович¹, І.В. Пампуха¹, Н.С. Нурищенко¹, Ю.І. Прилуцький¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка; e-mail: prylut@ukr.net;

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця Національної академії наук України, Київ

Проведено порівняння біомеханічних та біохімічних маркерів розвитку втоми muscle soleus та muscle gastrocnemius щурів упродовж 2 діб після п'ятиденного застосування антиоксиданта C_{60} -фулерену (щоденна доза $1 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$). Встановлено, що його тривале застосування підвищує силовий відгук м'яза на тлі розвитку м'язової втоми на 60–65 та 35–40% у повільному та швидкому м'язі відповідно. Залишкова дія водорозчинного C_{60} -фулерену на повільний м'яз залишається суттєвою (20–25%) навіть після 2 діб після припинення введення препарату. Водночас залишкова дія на швидкий м'яз на 2-гу добу залишається на мінімальному рівні, що істотно не підвищує працездатність м'яза. Тривале застосування водорозчинного C_{60} -фулерену сприяє зниженню окисних процесів на 30–40% у швидких та на 21–25% у повільних м'язах завдяки підтриманню балансу між прооксидантами та системою антиоксидантного захисту. Порівняльний аналіз маркерів окисного стресу та показників стану систем антиоксидантного захисту у швидких і повільних м'язах показав, що залишковий терапевтичний ефект водорозчинного C_{60} -фулерену після його тривалого використання на 30–40% вищий у muscle soleus, ніж у muscle gastrocnemius. Отримані результати свідчать про тривалу кінетику виведення водорозчинного C_{60} -фулерену з організму, що сприяє тривалій (мінімум 2 доби) компенсаторній активації ним ендогенної антиоксидантної системи у відповідь на стимуляцію м'язів, що слід враховувати при розробці нових терапевтичних препаратів на його основі. Ключові слова: muscle soleus; muscle gastrocnemius; м'язова втома; C_{60} -фулерен; біомеханічні параметри м'язового скорочення; біохімічні показники м'язової тканини.

ВСТУП

Однією з найважливіших характеристик м'язової системи людини є її здатність підтримувати заданий рівень генерації зусилля впродовж певного часового проміжку. Якщо чинники, що індукують скорочення, продовжують надходити до м'яза з постійною інтенсивністю, а рівень сили, що генерується ним, поступово зменшується, тоді виникає м'язова втома. Наразі не існує єдиного механізму її розвитку [1], адже цей феномен може бути наслідком порушення функціонування центральної нервової системи (ЦНС), дисфункції периферичних нервів та нервово-м'язових з'єднань, фізіологіч-

них змін у самих скелетних м'язах. Втома проявляється після фізичних навантажень різної інтенсивності, часто призводить до виникнення гострого болю та формування різних хронічних патологічних станів [2]. Відомо, що у процесі формування м'язової втоми порушується метаболізм, зокрема утворюються продукти неповного окиснення кисню (реактивні форми кисню – РФК): перекиси, вільні радикали, іони кисню [3]. Надмірне накопичення РФК (оксидативний стрес) спричинює серйозні функціональні порушення, оскільки ушкоджуються різні компоненти клітин. Прикладом є ініціювання перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) біо-

© Д.М. Ноздренко, О.О. Гончар, К.І. Богуцька, М.М. Охромович, І.В. Пампуха, Н.С. Нурищенко, Ю.І. Прилуцький

логічних мембран, що сприяє порушенню їх структури та підвищенню проникності [4].

Відомо, що у структурі м'язів розрізняють волокна двох типів: повільні та швидкі. Вони являють собою самостійні функціональні одиниці [5], які відрізняються не лише скорочувальними, а й морфологічними і біохімічними властивостями [6]. Ймовірно, що у muscle soleus, з високим вмістом міоглобіну, всі метаболічні та біохімічні процеси відбуваються за аеробних умов, внаслідок чого використовується велика кількість мітохондріальних ферментів та накопичується окиснена форма глутатіону, яка з часом не встигає відновлюватися [7]. Водночас перераховані вище процеси у muscle gastrocnemius відбуваються за анаеробних умов. Це є причиною більш повільного процесу окиснення глутатіону та збільшення кількості його відновленої форми [8]. У разі фізіологічної рухової активності, в процес якої залучені як повільні, так і швидкі м'язи, дія терапевтичних препаратів на їх втому буде відрізнятися завдяки різному впливу на метаболічні процеси. Це ускладнює не лише підбір адекватного алгоритму терапевтичних заходів, але й оптимізацію дозових навантажень застосованих препаратів. У цьому контексті важливим питанням також є аналіз кінетики залишкового впливу фармакологічних речовин після припинення терапії. Таким чином, кінетика виведення застосованих препаратів та їх залишкова дія на різні типи м'язових волокон є одним з найважливіших аспектів для розробки ефективної терапії м'язових дисфункцій.

Патологічні дисфункції у м'язовій тканині за надмірних силових навантажень виникають у разі надмірного накопичення РФК, пероксидів та їх вторинних продуктів за неспроможності антиоксидантної системи забезпечити підтримання про- та антиоксидантної рівноваги [9]. Як потенційні антиоксиданти можуть розглядатися вуглецеві наноструктури, одними з яких є біосумісні та біодоступні C_{60} -фулерени [10]. Вони

легко приєднують до шести електронів і, завдяки цьому, можуть діяти як ефективні уловлювачі РФК [11]. Антиоксидантні властивості водорозчинних наночастинок C_{60} -фулеренів були випробувані *in vivo* за умов різних патологічних станів м'язової системи [9]. Таким чином, можна припустити ефективність антиоксидантної дії C_{60} -фулерену проти деяких симптомів втоми скелетних м'язів.

Метою нашої роботи було дослідити вплив залишкової дії водорозчинного C_{60} -фулерену на скорочення muscle soleus та muscle gastrocnemius щурів за розвитку втоми.

МЕТОДИКА

Для отримання водного розчину C_{60} -фулеренів (C_{60} ФВР) був застосований метод, який ґрунтується на переведенні молекул C_{60} -фулерену з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком [12, 13]. Для цього змішували насичений розчин чистого C_{60} -фулерену в толуолі (чистота >99,5%), де його концентрація відповідає максимальній розчинності близько $2,9 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, та однаковий об'єм дистилату у відкритому стакані. Утворену водну фазу піддавали дії ультразвуку (частота 8 Гц упродовж 8–10 год). Одержаний C_{60} ФВР у разі максимальної концентрації $0,15 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ є типовою молекулярно-колоїдною системою, що містить як поодинокі молекули C_{60} , так і їх агреговані наночастинок [14]. C_{60} ФВР є високостабільним розчином упродовж 12–18 міс при $+4^\circ\text{C}$.

Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Вістар віком 2 міс і масою $170 \pm 12 \text{ г}$. Роботу з тваринами проводили за протоколом дослідження, який був затверджений комісією з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, що узгоджено з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, котрі використовуються для експериментальних

та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і нормами біомедичної етики відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р., м. Київ) під час проведення медико-біологічних досліджень. Тварин розділили на три групи по 7 у кожній. До I групи ввійшли інтактні тварини, до II – контрольні (втома, без введення C_{60} ФВР) і до III – експериментальні тварини (втома, внутрішньоочеревинне введення C_{60} ФВР). Об'єктом дослідження були: повільний м'яз, *muscle soleus*, та швидкий м'яз, *muscle gastrocnemius*. Втому викликали трьома послідовними стимуляційними імпульсами частотою 50 Гц та тривалістю 5 с кожний без релаксаційного періоду між ними. Сукупність таких стимуляційних подразнень становила 500 с, після яких проводили 5-хвилинну релаксацію.

При попередній підготовці до експерименту анестезію здійснювали внутрішньоочеревинним введенням нембуталу ($40 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$). Стандартна підготовка включала канюлювання (а. *carotis communis sinistra*) для вимірювання тиску та ламінектомію на рівні поперекового відділу спинного мозку. *Muscle soleus* та *muscle gastrocnemius* звільняли від навколишніх тканин, у дистальній частині його сухожильну частину приєднували до датчиків вимірювання сили. Для підготовки до модульованої стимуляції еферентів у відповідних сегментах перерізували вентральні корінці безпосередньо в місця їхнього виходу зі спинного мозку.

Динамічні властивості м'язового скорочення досліджували за умов активації м'яза з використанням методу модульованої стимуляції еферентів [9]. Філаменти перерізаних вентральних корінців закріплювали на стимулюючих електродах і здійснювали циклічний розподіл послідовності стимулів. Зовнішнє навантаження на м'яз контролювали за допомогою системи механостимуляторів. Силу скорочення вимірювали за допомогою тензодатчиків. У процесі аналізу отриманих

результатів використовували такий біомеханічний параметр, як інтегрована потужність м'яза (розрахована площа під силовою кривою), що є показником його загальної працездатності за застосованих стимуляційних пулів [9].

Для оцінки рівня окисних процесів у м'язових тканинах щурів вивчали вміст вторинних продуктів ПОЛ, які реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) [15]. Метод базується на здатності 2-тіобарбітурової кислоти реагувати з малоновим діальдегідом при високій температурі з утворенням забарвлених продуктів реакції зі спектром поглинання 532 нм. Вміст ТБК-активних продуктів у тканині м'язів щурів розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції ($1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$).

Вміст перекису водню досліджували за допомогою методу, в основі якого покладено окиснення Fe^{2+} у реакції Fe^{3+} з ксиленоловим оранжевим [16]. Для цього до гомогенату тканини було додано реагент ($500 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ сульфату амонію, $50 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ сірчаної кислоти, $200 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ ксиленолового оранжевого та $200 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ сорбітолу). Екстинкцію комплексу Fe^{3+} -ксиленоловий оранжевий було визначено при довжині хвилі 560 нм. Вміст H_2O_2 розраховували за допомогою стандартної кривої H_2O_2 для кожного незалежного експерименту.

Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали спектрофотометрично [17]. Метод ґрунтується на здатності СОД гальмувати аутоокиснення адреналіну при рН 10,2. У кювету, що містила $0,15 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ карбонатного буферу (рН 10,2), вносили 100 мкл гомогенату тканин. Реакцію «запускали» додаванням $2 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ розчину адреналіну. Зміну екстинкції фіксували щохвилинно при довжині хвилі 480 нм упродовж 5 хв. Активність СОД розраховували з урахуванням того, що 50% інгібування реакції відповідає $1 \text{ ум.од. активності}$.

Активність каталази визначали спектрофотометрично за методом [18], який базується

ся на здатності солей молібдену утворювати забарвлений комплекс з пероксидом водню, який визначали при довжині хвилі 410 нм. Активність ферменту розраховували з використанням коефіцієнта молярної екстинкції ($22,2 \cdot 10^3$ ммоль⁻¹·см⁻¹).

Вміст відновленого глутатіону визначали за допомогою реактиву Елмана. Гомогенат з м'язів щурів був доданий до 0,5 мл реактиву Елмана (5,5'-дитіобіс-нітробензойна кислота в етанолі) та 0,4 ммоль·л⁻¹ тріс-НСІ-буферу з 2 ммоль·л⁻¹ EDTA; рН 8,9. Зміну екстинкції фіксували щохвилинно при довжині хвилі 412 нм упродовж 5 хв [19].

Активність селензалежної глутатіон-пероксидази визначали реєстрацією швидкості окиснення НАДФН за наявності відновленого глутатіону (10 ммоль·л⁻¹), EDTA (1 ммоль·л⁻¹), перекису водню (0,25 ммоль·л⁻¹), азиду натрію (2 ммоль·л⁻¹), НАДФН (1,5 ммоль·л⁻¹) та надлишку глутатіонредуктази (2,4 од·мл⁻¹) при довжині хвилі 340 нм [23].

Досліджували механокінетичні та біохімічні зміни у тварин після 5-добового введення C₆₀ФВР у щоденній дозі 1 мг·кг⁻¹ на 1-шу і 2-гу добу після припинення введення препарату. Важливо зазначити, що використана доза C₆₀ФВР в експериментах була значно нижчою за значення LD₅₀, яка за перорального введення щурам становила 600 мг·кг⁻¹ [20], а за внутрішньоочеревинного введення мишам – 721 мг·кг⁻¹ [21].

Результати обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 8.0. Кожна з експериментальних силових кривих є результатом усереднення 10 аналогічних експериментів. Біохімічні результати представлено як середнє значення ± стандартна помилка середнього для кожної групи (вимірювання повторювали тричі). Відмінності між експериментальними групами виявляли за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшим тестом множинного порівняння Бонферроні. Значення P < 0,05 вважали вірогідними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1, а показано зміну сили скорочень muscle soleus і muscle gastrocnemius щурів при застосуванні 50 Гц стимуляції тривалістю 5 с трьома послідовними пулами тривалістю 500 с кожний з 5-хвилинною релаксацією між ними на 1-шу і 2-гу добу після припинення 5-денного введення C₆₀ФВР. Трикомпонентна стимуляція м'яза обрана на основі раніше отриманих даних [22] про максимальний рівень розвитку процесів втоми саме при такому характері стимуляцій, які вичерпують можливості адаптаційної перебудови м'язової системи до значних фізичних навантажень і передбачають наявність повного комплексу м'язових дисфункцій.

Одержані результати в рамках силового відгуку muscle soleus і muscle gastrocnemius щурів (див. рис. 1, а) підтверджують дані [23] про більш високу чутливість швидких м'язових волокон до розвитку втоми. Аналіз інтегрованої потужності м'яза (див. рис. 1, б) виявив суттєву відмінність у розвитку процесів втоми, яка сягала 31 ± 3 , 39 ± 1 та $47 \pm 4\%$ на 1, 2 та 3-му пулі стимуляції, відповідно. Ін'єкції C₆₀ФВР спричинили підвищення рівня цього параметра. На 5-й день терапії показники інтегрованої потужності м'яза підвищилися на 59 ± 3 , 47 ± 3 та $34 \pm 3\%$ для muscle soleus та на 42 ± 3 , 35 ± 3 та $27 \pm 2\%$ для muscle gastrocnemius відповідно. На 2-гу добу після припинення введення C₆₀ФВР його залишковий ефект становив 39, 30 і 25% для muscle soleus та 17, 12 і 9% для muscle gastrocnemius відповідно. Таким чином, залишкова терапевтична дія C₆₀ФВР на швидкі та повільні м'язи відрізнялася більш ніж удвічі.

Отже, отримані результати силового відгуку м'яза на тлі розвитку м'язової втоми свідчать про те, що введення C₆₀ФВР знижує рівень тяжкості патологічних процесів на 60–65 та 35–40% у повільному та швидкому м'язах відповідно. Залишкова дія на повільний м'яз залишається суттєвою

(20–25%) навіть після припинення введення препарату упродовж наступних 2 діб, а на швидкий м'яз на 2-гу добу лишається на мінімальному рівні, що істотно не підвищує працездатність м'яза.

Зміна біохімічного складу тканин м'язів досліджуваних тварин за розвитку м'язової втоми є відображенням тих процесів, що виникають як у м'язовому комплексі загалом, так і на рівні допоміжних органів і тканин. Було проведено порівняння вмісту антиоксидантних ферментів, виділених з тканин м'язів досліджуваних тварин, підданих стимуляційній втомі, без та за введення препарату (рис. 2).

Зміна вмісту ТБК-активних продуктів після виникнення втоми становила $8,1 \pm 0,5$ нмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ білка для muscle soleus та $9,1 \pm 0,4$ нмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ білка для muscle gastrocnemius ($3,1 \pm 0,2$ нмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ білка в інтактній групі). На 5-ту добу експерименту ці показники сягали

$4,9 \pm 0,2$ нмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ білка для muscle soleus та $5,1 \pm 0,3$ нмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ білка для muscle gastrocnemius. Після припинення застосування C_{60} ФВР його залишковий ефект на 1-шу та 2-гу добу становив 19 і 14% для muscle soleus та 12 і 8% для muscle gastrocnemius відповідно (див. рис. 2, а).

Викликана втома змінила вміст H_2O_2 , які становили $5,5 \pm 0,2$ та $5,7 \pm 0,2$ мкмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ білка для muscle soleus та muscle gastrocnemius відповідно ($1,9 \pm 0,1$ мкмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ білка в інтактній групі). На 5-ту добу експерименту ці показники сягали $2,8 \pm 0,1$ та $3,2 \pm 0,1$ мкмоль $\cdot$ л $^{-1}$ $\cdot$ мг $^{-1}$ білка відповідно. Після припинення застосування C_{60} ФВР його залишковий ефект на 1-шу та 2-гу добу становив 18 і 10% для muscle soleus та 7 і 5% для muscle gastrocnemius відповідно (див. рис. 2, а).

Активність СОД після виникнення втоми у muscle soleus сягала $6,8 \pm 0,5$ ум.од. $\cdot$ мг $^{-1}$

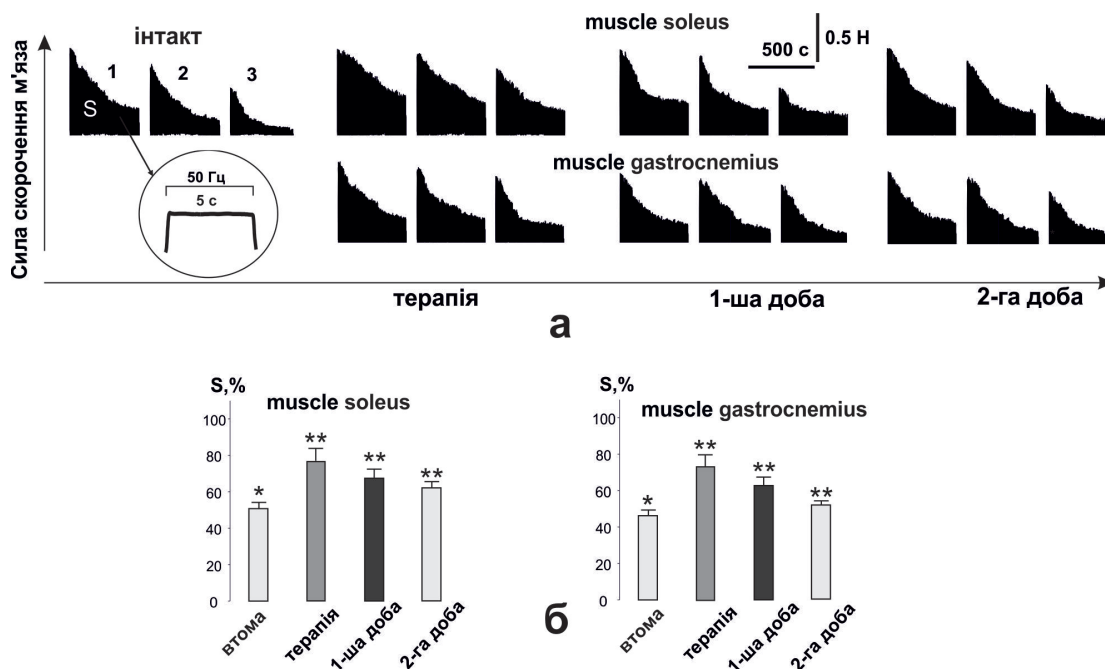


Рис. 1. Силкові відгуки muscle soleus і muscle gastrocnemius щурів при застосуванні 50 Гц стимуляції тривалістю 5 с трьома послідовними пулами 500 с кожний з 5-хвилинною релаксацією між ними: а – механограми м'язового скорочення; б – інтегрована потужність м'яза (S, загальна площа під силовою кривою, представлена у відсотках від значень, одержаних в інтактній групі, які приймали за 100%); терапія – введення водного розчину C_{60} -фулеренів (C_{60} ФВР) упродовж 5 діб; 1-ша доба та 2-га доба – доби, після припинення застосування C_{60} ФВР. * $P < 0,05$ щодо інтактної групи; ** $P < 0,05$ щодо контрольної (втома) групи

білка, а у muscle gastrocnemius – $7,2 \pm 0,5$ ум.од.·мг⁻¹ білка ($1,7 \pm 0,1$ ум.од.·мг⁻¹ білка в інтактній групі). На 5-ту добу експерименту ці показники становили $4,1 \pm 0,2$ та $4,4 \pm 0,2$ ум.од.·мг⁻¹ білка для muscle soleus та muscle gastrocnemius відповідно. Після припинення застосування C₆₀ФВР його залишковий ефект на 1-шу та 2-гу добу сягав 13 і 8% для muscle soleus та 8 і 5% для muscle gastrocnemius відповідно (див. рис. 2, а).

Активність каталази після виникнення втоми становила $4,6 \pm 0,2$ та $4,9 \pm 0,2$ мкмоль·л⁻¹·хв⁻¹·мг⁻¹ білка для muscle soleus та muscle gastrocnemius відповідно ($1,8 \pm 0,1$ мкмоль·л⁻¹·хв⁻¹·мг⁻¹ білка в інтактній групі). На 5-ту добу експерименту ці показники сягали $3,1 \pm 0,1$ та $3,5 \pm 0,1$ мкмоль·л⁻¹·хв⁻¹·мг⁻¹ білка відповідно. Після припинення застосування C₆₀ФВР його залишковий ефект на 1-шу та 2-гу добу становив 17 і

15% для muscle soleus та 7 і 5% для muscle gastrocnemius відповідно (див. рис. 2, б).

Концентрація відновленого глутатіону після виникнення втоми становила у muscle soleus $2,5 \pm 0,1$ мкмоль·л⁻¹·мг⁻¹ білка, а у muscle gastrocnemius – $2,5 \pm 0,1$ мкмоль·л⁻¹·мг⁻¹ білка ($1,1 \pm 0,1$ мкмоль·л⁻¹·мг⁻¹ білка в інтактній групі), а на 5-ту добу експерименту – $1,5 \pm 0,1$ та $1,7 \pm 0,1$ мкмоль·л⁻¹·мг⁻¹ білка. Після припинення застосування C₆₀ФВР його залишковий ефект на 1-шу та 2-гу добу сягав 18 і 8% для muscle soleus та 12 і 6% для muscle gastrocnemius відповідно (див. рис. 2, б).

Після виникнення втоми концентрація глутатіонпероксидази у muscle soleus сягала $6,5 \pm 0,3$ нмоль·л⁻¹ НАДФН хв⁻¹·мг⁻¹ білка, а у muscle gastrocnemius – $8,8 \pm 0,3$ нмоль·л⁻¹ НАДФН·хв⁻¹·мг⁻¹ білка ($4,1 \pm 0,2$ нмоль·л⁻¹ НАДФН·хв⁻¹·мг⁻¹ білка в інтактній групі), а на 5-ту добу експерименту – $4,9 \pm 0,4$ та

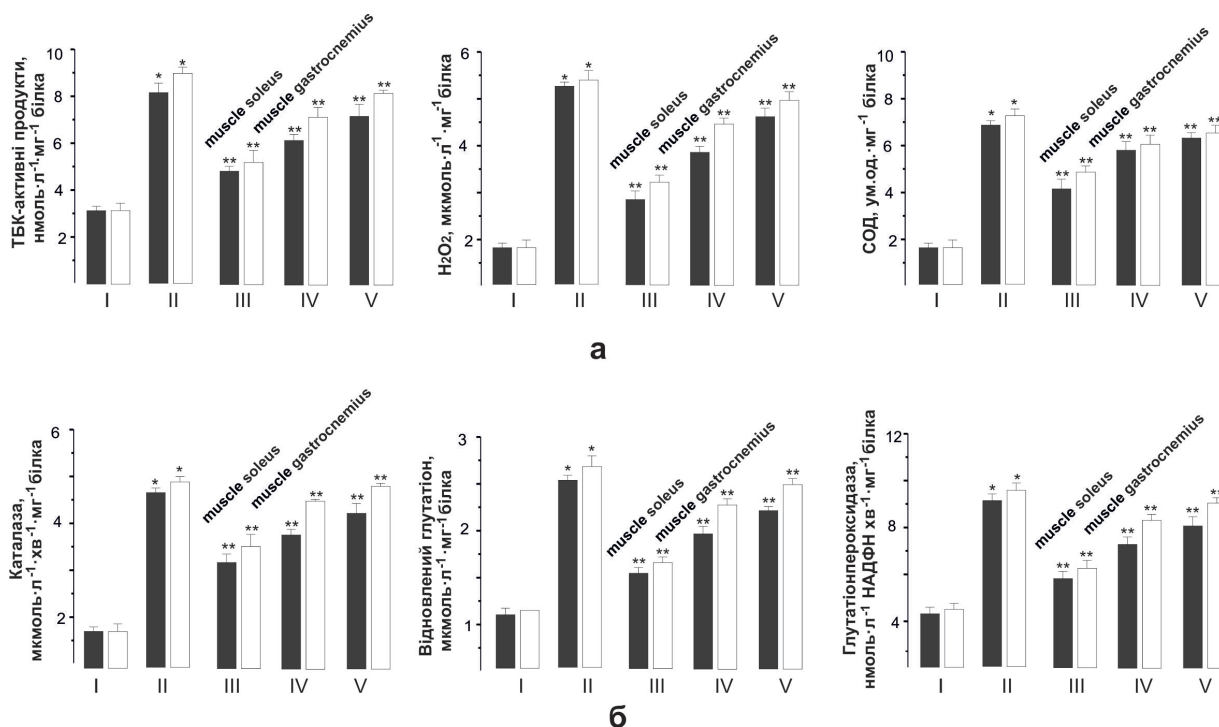


Рис. 2. Показники про- та антиоксидантного балансу у тканинах м'язів щурів після застосування трикомпонентної стимуляції: ТБК-активні продукти (вторинні продукти перекисного окиснення ліпідів, які утворюються у реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою), H₂O₂ та супероксиддисмутаза (СОД) (а); каталаза, відновлений глутатіон та глутатіонпероксидаза (б); I – інтактні, II – втома, III – введення водного розчину C₆₀-фулеренів (C₆₀ФВР) упродовж 5 діб; IV і V – 1-ша і 2-га доба відповідно після припинення застосування C₆₀ФВР. *P < 0,05 щодо групи I; **P < 0,05 щодо групи II

$5,2 \pm 0,4$ нмоль·л⁻¹ НАДФН·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. Після припинення застосування C₆₀ФВР його залишковий ефект на 1-шу та 2-гу добу становив 19 і 13% для muscle soleus та 12 і 6% для muscle gastrocnemius відповідно (див. рис. 2, б).

Проведені дослідження показали, що на 2-гу добу після припинення введення C₆₀ФВР у м'язах щурів на тлі зниження процесів ПОЛ активність про- та антиоксидантного балансу залишається значною. Це свідчить про збереження у віддалений період досліду достатнього рівня дисмутації агресивного супероксид-аніона. Зниження вмісту H₂O₂ за цих умов є доказом узгодженої дії антипероксидних ферментів – каталази та глутатіонпероксидази, активність яких теж зростає. Ймовірно, це зумовлено формуванням реакцій адаптації організму до дії надзвичайного подразника. На цьому тлі застосування водорозчинних C₆₀-фулеренів, як потужних антиоксидантів, здатне посилювати і сприяти подальшій активізації вищезазначених процесів. Доказом є попередні дослідження, які підтвердили, що використання C₆₀-фулеренів за екстремальних умов впливає на швидке формування пристосувальних реакцій організму завдяки впливу на такі транскрипційні фактори, як Nrf2, NF-κB та p53 [24,25].

ВИСНОВКИ

Аналіз отриманих результатів засвідчив позитивну динаміку сили м'язового скорочення, маркерів окисного стресу та показників стану систем антиоксидантного захисту у швидких та повільних м'язах щурів за тривалого (5 діб) внутрішньоочеревинного введення C₆₀ФВР у низькій терапевтичній дозі (загальна доза 5 мг·кг⁻¹). Так, застосування C₆₀ФВР підвищує силовий відгук м'яза на тлі розвитку м'язової втоми на 60–65 та 35–40% у повільному та швидкому м'язі відповідно. Його залишкова дія на повільний м'яз залишається суттєвою (20–25%) навіть після 2-ї доби після припинення введення препарату, на швидкий м'яз на 2-гу добу вона залишається

на мінімальному рівні, що істотно не підвищує працездатність м'яза. Застосування C₆₀ФВР сприяє зниженню окисних процесів на 30–40% у швидких та на 21–25% у повільних м'язах завдяки підтриманню балансу між прооксидантами та системою антиоксидантного захисту. Порівняльний аналіз маркерів окисного стресу та показників стану систем антиоксидантного захисту у швидких і повільних м'язах показав, що залишковий терапевтичний ефект C₆₀ФВР після його тривалого використання на 30–40% вищий у muscle soleus, ніж у muscle gastrocnemius.

Таким чином, вищенаведені результати свідчать про перспективу застосування C₆₀ФВР, як потенційних терапевтичних наноагентів, для підвищення ефективності функціонування скелетних м'язів модифікацією РФК-залежних механізмів, що відіграють важливу роль у процесі розвитку м'язової втоми.

Робота виконана в межах наукової тематики НДР (проект № 21БП018-01Р).

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

D.M. Nozdrenko¹, O.O. Gonchar², K.I. Bogutska¹, M.M. Okhramovych¹, I.V. Pampuha¹, N.E. Nurishchenko¹, Yu.I. Prylutskyy¹

RESIDUAL EFFECT OF WATER-SOLUBLE C₆₀ FULLERENE ON THE MUSCLE SOLEUS AND MUSCLE GASTROCNEMIUS CONTRACTION IN RATS WITH THE DEVELOPMENT OF FATIGUE

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv;
e-mail: prylut@ukr.net;

²O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

A comparison of biomechanical and biochemical markers of muscle soleus and muscle gastrocnemius fatigue in rats for two days after 5 days of using antioxidant C₆₀ fullerene (daily dose

was 1 mg·kg⁻¹) was performed. It was shown that its long-term use to increase muscle strength response against the background of muscle fatigue by 60-65 and 35-40% in slow and fast muscle, respectively. The residual effect of water-soluble C₆₀ fullerene on slow muscle remains significant (20-25%) even after 2 days after discontinuation of the drug. At the same time, its residual effect on fast muscle on the 2nd day remains at a minimum level, which does not significantly increase muscle performance. Prolonged usage of water-soluble C₆₀ fullerene helps to reduce oxidative processes by 30-40% in fast and by 21-25% in slow muscles by maintaining a balance between prooxidants and antioxidant defense system. A comparative analysis of oxidative stress markers and indicators of the state of antioxidant defense systems in fast and slow muscles showed that the residual therapeutic effect of water-soluble C₆₀ fullerene after long-term use is 30-40% higher in muscle soleus than in muscle gastrocnemius. The obtained results demonstrate the long-term kinetics of water-soluble C₆₀ fullerene excretion from the body, which contributes to long-term (at least two days) compensatory activation of the endogenous antioxidant system in response to muscle stimulation, which should be considered when developing new therapeutic drugs based on it.

Key words: muscle soleus; muscle gastrocnemius; muscle fatigue; C₆₀ fullerene; biomechanical parameters of muscle contraction; biochemical indicators of muscle tissue.

REFERENCES

- Boyas S, Guével A. Neuromuscular fatigue in healthy muscle: underlying factors and adaptation mechanisms. *Ann Phys Rehabil Med*. 2011;54(2):88-108.
- Schomburg ED, Steffens H, Pilyavskii AI, Maisky VA, Brück W, Dibaj P, Sears TA. Long lasting activity of nociceptive muscular afferents facilitates bilateral flexion reflex pattern in the feline spinal cord. *Neurosci Res*. 2015;95:51-8.
- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev*. 2008;88(1):287-332.
- Martarelli D, Pompei P. Oxidative stress and antioxidant changes during a 24-hours mountain bike endurance exercise in master athletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 2009;49(1):122-7.
- Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol*. 2001;115(5):359-72.
- Van Wessel T, de Haan A, van der Laarse WJ, Jaspers RT. The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur J Appl Physiol*. 2010;110(4):665-94.
- Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Parmelee DJ, Fiebig R, Ji LL. Rigorous swim training deteriorates mitochondrial function in rat heart. *Acta Physiol Scand*. 1997;160(2):139-48.
- Leeuwenburgh C, Ji LL. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316(2):941-9.
- Nozdrenko D, Abramchuk O, Prylutska S, Vygovska O, Soroca V, Bogutska K, et al. Analysis of biomechanical parameters of muscle 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.
- Prylutsky YuI, Vereshchaka IV, Maznychenko AV, Bulgakova NV, Gonchar OO, Kyzyma OA, et al. C₆₀ fullerene as promising therapeutic agent for correcting and preventing skeletal muscle fatigue. *J Nanobiotechnol*. 2017;15(1):8.
- Ferreira CA, Ni D, Rosenkrans ZT, Cai W. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials. *Nano Res*. 2018;11(10):4955-84.
- Golub A, Matyshevska O, Prylutska S, Sysoyev V, Ped L, Kudrenko V, et al. Fullerenes immobilized at silica surface: topology, structure and bioactivity. *J Mol Liq*. 2003;105(2-3):141-7.
- Scharff P, Ritter U, Matyshevska OP, Prylutska SV, Grynyuk II, Golub AA, Prylutsky Yul, Burlaka AP. Therapeutic reactive oxygen generation. *Tumori*. 2008;94(2):278-83.
- Halenova TI, Vareniuk IM, Roslova NM, Dzerzhynsky ME, Savchuk OM, Ostapchenko LI, et al. Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C₆₀ fullerene against CCl₄-induced acute liver injury in rats. *RSC Adv*. 2016;6(102):100046-55.
- Stal'naya ID, Garishvili TG. *Sovremenny'e metody` v biokhimi*. Pod red. VN Orekhovicha. M.: Meditcina. 1977:66-8. [Russian].
- Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol*. 1994;233:182-9.
- Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-5.
- Korolyuk MA, Ivanova LI, Majorova IG, Tokarev VE. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy. *Lab Delo*. 1988;1:16-9. [Russian].
- Flohé I, Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.
- Żebrowska A, Sadowska-Krepa E, Stanula A, Waśkiewicz Z, Łakomy O, Bezuglov E, et al. The effect of vitamin D supplementation on serum total 25(OH) levels and biochemical markers of skeletal muscles in runners. *J Int Soc Sports Nutr*. 2020;17(1):18.
- Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. [60]fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*. 2005;5(12):2578-85.
- Prylutska SV, Grebinyk AG, Lynchak OV, Byelinska IV, Cherepanov VV, Tauscher E, et al. In vitro and in vivo toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fuller Nanotub Carbon Nanostruct*. 2019;27:715.
- Nozdrenko D, Matvienko T, Vygovska O, Soroca V, Bogutska K, Zholos A, et al. Post-traumatic recovery of muscle soleus in rats is improved via synergistic effect of

- C_{60} fullerene and TRPM8 agonist menthol. Appl Nanosci. 2022;12(3):467-78.
24. Gonchar OO, Maznychenko AV, Klyuchko OM, Mankovska IM, Butowska K, Borowik A, Piosik J, Sokolowska I. C_{60} Fullerene reduces 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress disorders and mitochondrial dysfunction in rats by modulation of p53, Bcl-2 and Nrf2 targeted proteins. Int J Mol Sci. 2021;22(11):5444.
25. Vereshchaka IV, Bulgakova NV, Maznychenko AV, Gonchar OO, Prylutskyi YI, Ritter U, et al. C_{60} Fullerenes diminish muscle fatigue in rats comparable to N-acetylcysteine or β -alanine. Front Physiol. 2018;9:517.

*Матеріал надійшов
до редакції 18.05.2022*