



УДК 581.4:581

DOI <https://doi.org/10.29038/NCBio.21.1.102-110>

Терапевтичний вплив фулеренів C₆₀ на механокінетику розвитку процесів втоми у скелетних м'язах щурів, викликаних введенням пептидів кардіоемболічного інсульту

Ірина Дмитрук

Волинський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

Адреса для листування: irynachorna24@gmail.com

Отримано: 24.05.21; прийнято до друку: 15.06.21; опубліковано: 02.09.21

Резюме. Метою дослідження було з'ясувати вплив фракції пептидів гострої фази кардіоемболічного інсульту на показники параметрів скорочення скелетних м'язів, а також можливий терапевтичний вплив на розвиток м'язової дисфункції водорозчинного фулерену C₆₀. Зразки плазми крові були взяті у здорових осіб та пацієнтів із кардіоемболічним ішемічним інсультом. Ін'єкції пептидів вводили внутрішньовенно за 2 години до початку експерименту, фулерени C₆₀ – через годину після введення пептидів. Виділено такі експериментальні групи: контрольна, кардіоемболічний інсульт (гостра фаза), кардіоемболічний інсульт + ін'єкції фулерену C₆₀. Аналіз механограм втоми показав значне зменшення часу виникнення втоми м'язів, м'язової потужності і максимально можливого рівня генерації силового зусилля при застосуванні пептидів гострої фази кардіоемболічного інсульту. Терапевтичне застосування ін'єкцій C₆₀ фулерена істотно зменшує рівень цих патологій і стабілізує біомеханічні параметри скорочення м'яза. Виявлено, що C₆₀ фулерени здатні підтримувати активний м'яз у межах фізіологічної норми впродовж усього процесу скорочення. Отже, фулерени C₆₀ можна розглядати як потенційні засоби, що здатні корегувати патологічні стани м'язової системи.

Ключові слова: C₆₀ фулерени, кардіоемболічний інсульт, пептиди, m. soleus, м'язова втома.

C60 fullerenes influence the mechanokinetics of the fatigue development in rats skeletal muscles caused by the cardioembolic insult peptides

Iryna Dmytruk

Lesya Ukrainka Volyn European National University Lutsk, Ukraine

Correspondence: irynachorna24@gmail.com

Abstract. The purpose of the study was to determine the effect of the peptides fraction of the cardioembolic stroke acute phase on the parameters of skeletal muscle contraction, and to find out therapeutic effect on the development of muscle dysfunction of water-soluble fullerene C₆₀. Plasma samples were taken from healthy

individuals and patients with cardioembolic ischemic stroke. Peptide injections were administered intravenously 2 hours before the start of the experiment. C₆₀ fullerenes were administered one hour after peptide administration. The following experimental groups were identified: control, cardioembolic stroke (acute phase), cardioembolic stroke + C₆₀ fullerene injections. Analysis of fatigue mechanograms showed a significant reduction in the time of muscle fatigue onset, muscle power and the maximum possible level of force generation during using peptides of the cardioembolic stroke acute phase. Therapeutic use of C₆₀ fullerene injections significantly reduces the level of these pathologies and stabilizes the biomechanical parameters of muscle contraction. C₆₀ fullerenes have been shown to be able to maintain active muscle within physiological limits throughout the contraction process. Thus, C₆₀ fullerenes can be considered as potential agents capable of correcting pathological conditions of the muscular system.

Keywords: C₆₀ fullerenes, cardioembolic stroke, peptides, m. soleus, muscle fatigue.

ВСТУП

На сьогодні однією з основних причин смертності серед людей працездатного віку є захворювання серцево-судинної системи. Серед них смертність від інсульту варіює від 6,5 млн до 17,3 млн осіб на рік за різними джерелами [1, 2, 3]. Варто відзначити високий рівень інвалідизації (до 25%) після перенесеного захворювання, що потребує подальшої реабілітації [4]. Ішемічний інсульт найчастіше розвивається у зв'язку із звуженням чи оклюзією артерій, що знижує кровопостачання головного мозку [5, 6]. Одним із найпоширеніших видів ішемічного інсульту є кардіоемболічний інсульт, що локалізується в ділянці кровопостачання середньої мозкової артерії [7]. До патогенезу кардіоемболічного інсульту залучені різні процеси, включаючи запалення та дисфункцію ендотелію [8]. Запальний процес спричиняє додаткові пошкодження та провокує загибель клітин, з одного боку, а з іншого – відіграє роль у репарації організму. Внаслідок компенсаторних та запальних реакцій у кров виділяються пептиди різної молекулярної маси (н-д, фактори росту, статини, запальні цитокіни), що здатні змінювати функцію гладеньких м'язів судин, які кровопостачають мозок [9, 10, 11, 12, 13]. Цей запальний процес може залучати як мозкову тканину, так і весь організм [14].

На сьогодні достовірно невідомо, які саме білкові маркери провокують поширення вогнища кардіоемболічного інсульту. Важливо зрозуміти, як білки взаємодіють із м'язовою тканиною [15, 16, 17, 18]. Клінічні дослідження показали наявність у плазмі пацієнтів, які перенесли інсульт, специфічної фракції пептидів (до 5КДальтон), що відрізняються за складом від фракції пептидів, узятих у здорових пацієнтів. Такі пептиди можуть виділятися у кров'яне русло навіть через декілька років після одужання пацієнтів. Отже, вони здатні збільшувати рівень тонуусу м'язів, судин, що власне і є ключовим фактором у подальшому виникненні геморагічного інсульту. Виявлені особливості параметрів скорочення м'язів можуть сприяти у призначенні найбільш адекватних методів лікування з

метою мінімізації терапевтичних ризиків та уникнення рецидивів.

Мета: з'ясувати вплив фракції пептидів, узятих із плазми хворих на кардіоемболічний інсульт під час гострої фази на показники динамічних параметрів скорочення скелетних м'язів; виявити зміну тонуусу досліджуваних м'язів. З'ясувати можливий терапевтичний вплив на розвиток дисфункції скелетних м'язів антиоксиданту – фулерену C₆₀. Дослідити зміну загальної працездатності м'язів та рівень розвитку процесів втоми після введення досліджуваних пептидів та при терапевтичному введенні фулерену C₆₀.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Зразки плазми крові були взяті у 35 здорових осіб та 56 пацієнтів із кардіоемболічним ішемічним інсультом на базі Київської міської клінічної лікарні №4. Зразки плазми були підготовлені шляхом збору крові у вакуумні пробірки із вмістом цитрату натрію 3,8%.

Пул пептидів виділяли відповідно до методу, описаного Ніколайчик та ін. [Ніколайчик, В.; Мойн, В.; Кирковскій, В. Метод визначення молекули пептидного пулу. Лабораторна справа. 1991, 10, 13–18]. Діапазон отриманих пептидів – до 5 КДа. Вихідна концентрація всіх пептидів у кожному зразку становила 1 мг/мл.

Пептиди вводили в концентрації 0,1 мг/кг ваги тварини внутрішньовенно за 2 години до початку експерименту. Контрольним тваринам вводили пептиди крові здорових донорів у тих же концентраційних діапазонах. Фулерени C₆₀ вводили через годину після введення пептидів гострої фази кардіоемболічного інсульту, в концентрації 1 мг/кг ваги тварини.

Було сформовано такі експериментальні групи:

№ 1 – кардіоемболічний інсульт, гостра фаза;

№ 2 – кардіоемболічний інсульт + ін'єкції фулерену C₆₀.

Досліди проводили на білих нелінійних щурах масою 135-140 г. Анестезію тварин здійснювали

внутрішньочеревним введенням нембуталу (40 мг/кг). Зміну біомеханічних параметрів скорочення спостерігали на препараті *m. soleus*, реєстрували за допомогою тензодатчиків, до яких приєднували сухожилок досліджуваного м'яза. Для формування стимулюючих сигналів використовували програмовані генератори сигналів спеціальної форми. Стимуляцію здійснювали електричними імпульсами тривалістю 2 мс. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів.

Аналізували такі механокінетичні параметри тетанічного скорочення м'яза: максимальну силу скорочення (F_{max} , %), мінімальну силу скорочення (F_{min} , %), інтегровану потужність (S_F , %), час досягнення максимальної сили тетанічного скорочення (Δt_1 , мс), час утримання сили скорочення на стаціонарному рівні (Δt_2 , мс).

Обробку результатів дослідження проводили методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У нормі гладенький тетанус виникає при частотах 25-30 Гц, а в м'язі не розвиваються процеси втоми при тривалій низькочастотній стимуляції. Так, виникнення гладкого тетанічного скорочення при значно менших частотних діапазонах стимуляційного сигналу відбувається за умов підвищеного тону м'язових волокон, що викликано впливом

введених пептидів гострої фази кардіоемболічного інсульту. Така патологія має викликати значно більший рівень енергетичних витрат міоцитів і, як наслідок, більш високий ступінь розвитку процесів втоми. Отже, це дослідження було спрямоване на аналіз механограм втоми скорочувального процесу.

Показано, що введення пептидів гострої фази кардіоемболічного інсульту збільшує ступінь розвитку процесів втоми (рис. 1), тому наступний етап дослідження був спрямований на виявлення цих особливостей у скоротливому процесі м'яза. Було здійснено реєстрацію сили скорочення *muscle soleus* щура при використанні безрелаксаційної електростимуляції частотою 1 Гц та досліджено зміну розвитку силової відповіді. Вимірювали час зменшення сили скорочення до 50% (Δt_{50}) та 25% (Δt_{25}) від початкового рівня. М'яз уважався стомленим, якщо амплітуда поодиноких тетанічних скорочень зменшувалася більш ніж на 50% відносно початкового рівня. Аналіз механограм втоми скорочувального процесу показав, що у щурів, які отримали ін'єкції пептидів гострої фази, за даної стимуляції м'язова втома розвинулась більш ніж у два рази швидше порівняно з контролем. Виявлено, що час зменшення сили скорочення на 50% становив 1097 ± 20 с, на 25% – 1640 ± 14 с (рис. 4b). Водночас при застосуванні ін'єкцій C₆₀ фулерена відбулась стабілізація даного показника – +21% і +14% від контрольних значень відповідно. У контрольній групі втомлювальних процесів не спостерігалось.

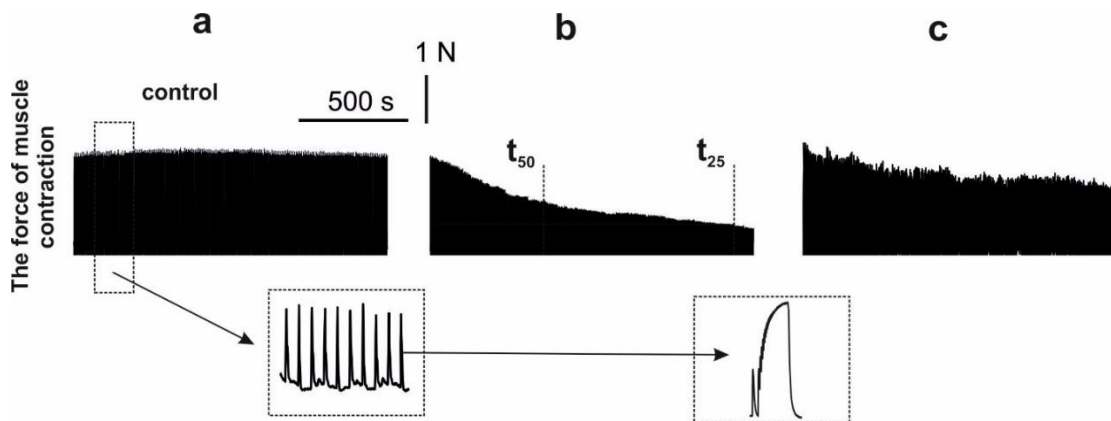


Рис. 1. Реєстрація сили скорочень *muscle soleus* щура за умови застосування 1-герцової стимуляції тривалістю 1800 секунд.

a – механограми скорочення *muscle soleus* (контрольні значення)

b – введення пептидів (кардіоемболічний інсульт, гостра фаза)

c – введення пептидів (кардіоемболічний інсульт, гостра фаза) + фулерен C₆₀

(t_{50}, t_{25}) – час зменшення силової відповіді на 50 та 25% від контрольних значень

Загальна інтегрована потужність, вирахована із загальної площі силової відповіді

м'язу, змешується на 40% при застосуванні пептидів гострої фази (рис. 2a). Аналіз часу

зменшення силової відповіді на 50 та 25% від контрольних значень показав аналогічні зміни сили скорочення *muscle soleus* щура за умови застосування 1-Гц стимуляції протягом 1800 с (рис. 4b). Показано, що f_{max} при застосуванні пептидів гострої фази зменшується на $1,5 \pm 0,4$ Н,

f_{min} – різко падає до рівня $0,2 \pm 0,02$ Н. При застосуванні ін'єкцій C_{60} фулерена f_{max} та f_{min} становили $2,9 \pm 0,4$ Н та $2,75 \pm 0,02$ Н. Важливо, що після ін'єкції фулерену сила скорочення м'яза не падала менше 50% від початкових значень у всіх проведених дослідженнях.

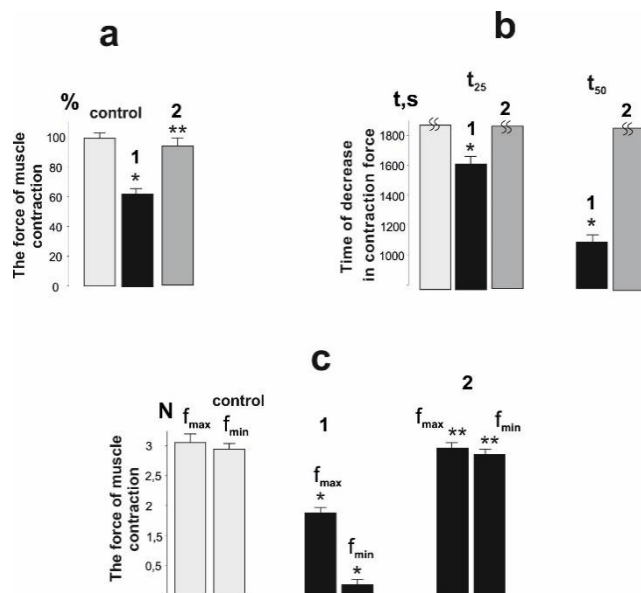


Рис. 2. Біомеханічні параметри скорочень *muscle soleus* щура під час застосування 1-герцової стимуляції тривалістю 1800 секунд.

a – інтегрована потужність, вирахована із загальної площі силової відповіді м'яза, представлена у відсотках від контрольних значень

b – час зменшення силової відповіді на 50 і 25% від контрольних значень (t_{50} , t_{25})

c – максимальна (f_{max}) та мінімальна (f_{min}) зафіксована сила скорочення м'яза протягом всієї стимуляції

control – контрольні механограми скорочення *muscle soleus*

1 – введення пептидів (кардіоеMBOLічний інсульт, гостра фаза)

2 – введення пептидів (кардіоеMBOLічний інсульт, гостра фаза) + фулерен C_{60}

* $p < 0.05$ відносно групи control; ** $p < 0.05$ відносно групи 1, *** $p < 0.05$ відносно групи 2

ОБГОВОРЕННЯ

Підвищений тонус м'язових волокон зумовлює виникнення гладкого тетанусу при низьких частотних діапазонах стимуляційного сигналу. У нашому дослідженні таке підвищення тону м'язів виникає під впливом введених пептидів гострої фази кардіоеMBOLічного інсульту. Дані пептиди потрапляють у кров'яне русло внаслідок ішемічного ушкодження тканин [19]. І скелетні, і гладенькі м'язи можуть бути чутливими до речовин, які виділяються в кров під час інсульту [20].

Аналіз механограм втоми показав значне зменшення часу виникнення втоми м'язів та зменшення м'язової потужності при застосуванні пептидів гострої фази. Показано, що введення

пептидів кардіоеMBOLічного інсульту має високий ступінь патологічного впливу на механокінетику скорочення *muscle soleus* щурів порівняно з контролем [21]. Ін'єкції пептидів гострої фази кардіоеMBOLічного інсульту значно зменшують час виникнення процесів втоми у м'язі, а також зменшують загальну м'язову потужність і максимально можливий рівень генерації силового зусилля. Терапевтичне застосування ін'єкцій C_{60} фулерена знижує рівень цих патологій. Разом з тим, C_{60} фулерени не стабілізують дані показники до контрольних значень.

C_{60} фулерени розглядають як потужні антиоксиданти, що здатні корегувати розвиток процесів втоми у скелетних м'язах [22, 23]. Вважається, що їх антиоксидантна дія є ефективною, ніж у інших відомих антиоксидантів

(вітамінів С, Е і каротиноїдів) [24, 25, 26]. C₆₀ фулерени можна розглядати як один із ефективних протизапальних засобів при лікуванні ішемічного інсульту, поряд із пероральними антикоагулянтними препаратами [27, 28, 29, 30, 31].

На підставі отриманих результатів можна зробити висновки про те, що ін'єкції пептидів, узятих у пацієнтів у період гострої фази кардіоемболічного інсульту, змінюють параметри механограм втому, збільшуючи патологічну дисфункцію м'язової активності. Терапевтичне застосування ін'єкцій C₆₀ фулерена істотно зменшує рівень описаних патологій. Стабілізація механокінетики скорочення в кардіоемболічній групі склала + 21% і + 14% від контрольних значень.

ВИСНОВКИ

Ін'єкції пептидів гострої фази кардіоемболічного інсульту викликають більш швидкий перехід у стадію гладкого тетанічного скорочення *muscle soleus* щурів. На нашу думку, це пов'язано з більш високим рівнем м'язового тону до досліджуваних м'язів.

C₆₀ фулерени, як потужні антиоксиданти, здатні перешкоджати виникненню дисфункції в активному м'язі і в такий спосіб підтримувати його в межах фізіологічної норми впродовж усього процесу скорочення. Це відкриває перспективу щодо проведення подальших клінічних випробувань водорозчинних C₆₀ фулеренів як потенційних терапевтичних засобів, здатних корегувати патологічні стани м'язової системи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Brown, I. A. M.; Diederich, L.; Good, M. E. et al. Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018, 38(9), pp 1969–1985. DOI: 10.1161/ATVБАН.118.311229.
2. Lombart, V.; Garcia-Berrocso, T.; Bustamante, A. et al. Cardioembolic stroke diagnosis using blood biomarkers. *Current cardiology reviews*. 2013, 9(4), pp 340–352. DOI: 10.2174/1573403x10666140214122633.
3. <https://phc.org.ua/news/29-zhovtnya-vsivsitniy-den-borotbi-z-insultom>
4. Торгалю, Є. О.; Раєцька, Я. Б.; Богданова, О. В. та ін. Особливості процесів

вільнорадикального окиснення ліпідів за умов експериментального геморагічного інсульту, а також вивчення дії антиоксидантних препаратів. *Фізика живого*. 2009, 17(1), с 155–158.

5. Мицкан, Б.; Єдинак, Г.; Остап'як, З. та ін. Інсульти: різновиди, фактори ризику, фізична реабілітація. *Фізичне виховання, спорт і культура здоров'я у сучасному суспільстві*. 2012, 3(19), с 295–302.

6. Radak, D.; Resanovic, I.; Isenovic, E. R. Link between oxidative stress and acute brain ischemia. *Angiology*. 2014, 65(8), pp 667–676. DOI: 10.1177/0003319713506516.

7. Kamel, H.; Healey, J. S. Cardioembolic stroke. *Circulation research*. 2017, 120(3), pp 514–526. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308407.

8. Piccardi, B.; Giralt, D.; Bustamante, A. et al. Blood markers of inflammation and endothelial dysfunction in cardioembolic stroke: systematic review and meta-analysis. *Biomarkers*. 2017, 22(3–4), pp 200–209. DOI:10.1080/1354750X.2017.1286689.

9. Бойків, Н. Д. Динаміка продукції факторів ангіогенезу при ішемічному інсульті залежно від тяжкості перебігу захворювання. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014, 3(2), с 106–109.

10. Park, I. H.; Hwang, H. M.; Jeon, B. H. et al. NADPH oxidase activation contributes to native low-density lipoprotein-induced proliferation of human aortic smooth muscle cells. *Experimental & molecular medicine*. 2015, 47(6), 168. DOI: 10.1038/emm.2015.30.

11. Yang, C.; Yang, Y.; DeMars, K. M. et al. Genetic deletion or pharmacological inhibition of cyclooxygenase-2 reduces blood-brain barrier damage in experimental ischemic stroke. *Frontiers in neurology*. 2020, 11, 887. DOI: 10.3389/fneur.2020.00887.

12. Lian, T.; Qu, D.; Zhao, X. et al. Identification of site-specific stroke biomarker candidates by laser capture microdissection and labeled reference peptide. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16(6), pp 13427–13441. DOI: 10.3390/ijms160613427.

13. Bolayir, A.; Gokce, S. F.; Cigdem, B. et al. Can SCUBE1 be used to predict the early diagnosis, lesion volume and prognosis of acute ischemic stroke? *Turkish Journal of Biochemistry*. 2019 44(1), pp 16–24. URL: <https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0040>.

14. Maida, C. D.; Norrito, R. L.; Daidone, M. et al. Neuroinflammatory mechanisms in ischemic

stroke: focus on cardioembolic stroke, background, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*. 2020, 21(18), 6454. DOI: 10.3390/ijms21186454.

15. Wei, L. K.; Quan, L. S. Biomarkers for ischemic stroke subtypes: a protein-protein interaction analysis. *Computational biology and chemistry*. 2019, 83, 107116. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2019.107116.

16. Zhao, X.; Yu, Y.; Xu, W. et al. Apolipoprotein A1-unique peptide as a diagnostic biomarker for acute ischemic stroke. *International journal of molecular sciences*. 2016, 17(4), 458. DOI: 10.3390/ijms17040458.

17. Shen, M.-Y.; Chen, F.-Y.; Hsu, J.-F. et al. Plasma L5 levels are elevated in ischemic stroke patients and enhance platelet aggregation. *Blood*. 2016, 127(10), pp 1336–1345. DOI: 10.1182/blood-2015-05-646117.

18. Richard, S.; Lagerstedt, L.; Burkhard, P. R. et al. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as biomarkers of 3-month outcome in cerebrovascular diseases. *Journal of inflammation (London, England)*. 2015, 12, 61. DOI: 10.1186/s12950-015-0106-z.

19. Brasileirol, J. L.; Fagundes, D. J.; Mijji, L. O. et al. Ischemia and reperfusion of the soleus muscle of rats with pentoxifylline. *European Journal of Physiotherapy*. 1979, 379, pp 209–214.

20. Irwin, J. C.; Fenning, A. S.; Vella, R. K. Geranylgeraniol prevents statin-induced skeletal muscle fatigue without causing adverse effects in cardiac or vascular smooth muscle performance. *Translational Research*. 2020, 215, 17–30. DOI: 10.1016/j.trsl.2019.08.004.

21. Springer, J.; Schust, S.; Peske, K. et al., Catabolic signaling and muscle wasting after acute ischemic stroke in mice: indication for a stroke-specific sarcopenia. *Stroke*. 2014, 45(12), pp 3675–3683. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.006258.

22. Nguyen, A.; Mellion, M.; Gilchrist, J. et al. Experimental alcohol-related peripheral neuropathy: role of Insulin/IGF resistance. *Nutrients*. 2012, 4(8), pp 1042–1057.

23. Xie, Q.; Perez-Cordero, E.; Echegoyen, L. Electrochemical detection of c60 and c70 enhanced stability of fullerides in solution. *Journal of the american chemical society*. 1992, 114, pp 3978–3980.

24. Smith, A.; Hayes, G.; Romaschin, A.; Walker, P. The role of extracellular calcium in

ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Journal of surgical research*. 1990, 49, pp 153–156.

25. Tountas, C. P.; Bergman, R. A. Tourniquet ischemia: ultrastructural and histochemical observations of ischemic human muscle and of monkey muscle and nerve. *Journal of Hand Surgery*. 1977, 31, pp 31–37.42.

26. Tsai, M. C.; Chen, Y. H.; Chiang, L. Y. Polyhydroxylated C60 fullereneol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus in vitro. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1997, 49(4), pp 438–445.

27. Cuzzocrea, S.; Riley, D. P.; Caputi, A. P.; Salvemini, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews*. 2001, 53, pp 135–159.

28. Prylutska, S. V.; Grynyuk, I. I.; Matyshevska, O. P.; et al. Antioxidant properties of C60 fullerenes in vitro. *Fullerenes. Nanotubes. Carbon Nanostructures*. 2008, 16, pp 698–705.

29. Kamel, H.; Healey, J. S. Cardioembolic Stroke. *Circulation research*. 2017, 120(3), pp 514–526. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308407.

30. Farhadi, M. B.; Fereidoni, M. Neuroprotective effect of menaquinone-4 (MK-4) on transient global cerebral ischemia/reperfusion injury in rat. *PLOS ONE*; 15(3), e0229769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229769>.

31. Zhao, Y.; Gan, Y.; Xu, G. et al. MSCs-derived exosomes attenuate acute brain injury and inhibit microglial inflammation by reversing cystl2r-erk1/2 mediated microglia m1 polarization. *Neurochemical Research*. 2020, 45(5), pp 1180–1190. DOI: 10.1007/s11064-020-02998-0.