

УДК 591.182: 612.015.6/018: 612.741: 57.084.1

ОЦЕНКА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА ЖИВОТНЫХ ЭФФЕКТОВ ДЛИТЕЛЬНО ВВОДИМОГО АЛЬФАКАЛЬЦИДОЛА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ

Труш В. В.¹, Соколов В. И.²

¹ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет», Донецк, Украина

²Гуманитарно-педагогическая академия (филиал) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Ялта, Республика Крым, Россия
E-mail: ver.trush@yandex.ru

В экспериментах на крысах с помощью электрофизиологических методов изучали влияние длительно вводимого альфакальцидола (АЛФ) в умеренной фармакологической дозе (0,06 мкг/кг, на протяжении от 10 до 60 дней) на функциональные параметры скелетной мышцы смешанного типа с преобладанием гликолитических волокон (*m. tibialis anterior*). Установлено, что АЛФ спустя 60 дней введения обусловил значимое в сравнении с контролем ($p < 0,05$) увеличение амплитуды одиночного (на 29 %) и тетанического (на 25–28 %) сокращений мышцы на фоне увеличения ее массы (на 27 %). Кроме этого, к данному сроку улучшались и силовые характеристики мышцы, в пользу чего свидетельствует значимо большее в сравнении с контролем ($p < 0,05$) отношение скорости развития тетануса при большей внешней нагрузке (70 г) относительно таковой при меньшей внешней нагрузке (20 г). Уже спустя 30 дней введения АЛФ наблюдалось улучшение относительно контроля скоростных характеристик мышцы, в пользу чего указывает увеличение скорости развития тетануса как при малых (на 58 %), так и больших внешних нагрузках (на 42 %), а также мощности тетанического сокращения (на 48 %). Спустя 60 дней ежедневного введения АЛФ наблюдалось значимое в сравнении с контролем ($p < 0,05$) увеличение продолжительности периода максимальной работоспособности мышцы (на 57 %), и уже после первых 10 дней введения АЛФ – более быстрое восстановление сократительных параметров мышцы после выполнения утомляющей работы.

Ключевые слова: скелетная мышца, витамин D, альфакальцидол, кальцитриол, крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Альфакальцидол (АЛФ) является частично активированной формой витамина D₃, которая в результате гидроксирования в различных тканях превращается в активный гормон – кальцитриол (КТ), или витамин-D-гормон [1]. Установлено, что витамин-D-гормон способен регулировать не только фосфорно-кальциевый баланс, как полагали ранее, но и оказывать влияние на многие физиологические процессы [2]. Так, доказана способность КТ участвовать в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток практически всех органов и тканей, обменных процессов в организме, функциональной активности сердечно-сосудистой, пищеварительной, иммунной, нервной и других систем организма [3]. В последние годы появляются данные в пользу способности КТ предотвращать развитие опухолевых заболеваний и уменьшать агрессивность их течения [4], предотвращать и ослаблять выраженность аутоиммунных реакций в организме [5], участвовать в регуляции

функционального состояния нервной системы, через стимуляцию синтеза нейротрофических агентов регулировать созревание и дифференцировку нервной ткани [6]. Выявлена способность КТ регулировать экспрессию IRS-I в клетках-мишенях для инсулина и ИФР-I [7], а также стимулировать экспрессию инсулиновых рецепторов в клетках-мишенях [8], тем самым оказывая влияние на реализацию эффектов инсулина в организме.

Наконец, в ряде исследований получены данные, свидетельствующие о позитивном влиянии КТ на мышечную систему. Так, выявлена способность КТ стимулировать метаболизм в мышечных волокнах (МВ) [9], увеличивать мышечную силу [10], стимулировать рост и дифференцировку МВ [11], повышать мышечную массу, диаметр и процент МВ II типа в скелетных мышцах (СМ) [12], улучшать их функцию у пожилых пациентов [13]. Некоторые авторы [14] высказывают предположение относительно эффективности КТ в снижении риска нервно-мышечных заболеваний. В литературе встречается и точка зрения, согласно которой дефицит КТ в организме может быть одной из причин мышечной боли, утомляемости и слабости у людей [15]. В частности, установлено, что дефицит витамина D может предопределять снижение синтеза мышечных белков, в том числе актина и тропонина, ослабление поглощения кальция саркоплазматическим ретикуломом (СР) и усиление апоптоза МВ [16], уменьшение диаметра МВ II типа [17], снижение мышечной силы, особенно в проксимальных группах мышц, и дегенеративные изменения МВ [6].

Установлено, что активация рецепторов для витамин-D-гормона (VDR) в скелетных МВ приводит к повышению активности генов, регулирующих их рост и дифференцировку, особенно МВ быстрого (гликолитического) типа, и подавлению активности миостатина – фактора, тормозящего синтез белков в МВ [17]. Обнаружена способность КТ ослаблять выраженность воспалительной реакции в МВ после сложной комбинированной физической нагрузки [18].

Вместе с тем, в наблюдениях некоторых авторов установлено, что улучшение функциональных параметров и массы СМ под действием АЛФ наблюдается только у обследуемых с исходным дефицитом витамина D [12, 19]. Еще в одной из работ показано, что позитивный эффект АЛФ на СМ может зависеть от возраста [20]. Имеются и сообщения о том, что лечение витамином D не оказывает достоверного позитивного влияния на мышечный аппарат пожилых людей [21]. В некоторых зарубежных обзорах литературы [22], основанных на клинических наблюдениях, а также исследованиях последних лет, выполненных на клеточных линиях и животных моделях, авторы приходят к выводу относительно неоднозначного влияния производных витамина D на структуру и функцию СМ.

Учитывая противоречивость литературных данных относительно влияния КТ на нервно-мышечный аппарат, отчасти обусловленных использованием разных доз витамина D и его метаболитов, а также разным возрастом обследуемых и сопутствующими патологиями, представляет интерес изучение в экспериментах на животных эффектов умеренных фармакологических доз АЛФ на состояние СМ смешанного типа, что позволит отчасти решить вопрос о его эффективности в плане улучшения мышечной функции.

В связи с этим *целью настоящей работы* явилось изучение в экспериментах на крысах электрофизиологических и сократительных параметров СМ смешанного типа (*m. tibialis anterior*) в динамике длительного введения в животный организм (на протяжении от 10 до 60 дней) АЛФ в дозе, соответствующей умеренной фармакологической для человека (0,06 мкг/кг/сутки). В качестве объекта исследования была выбрана передняя большеберцовая мышца, характеризующаяся существенным преобладанием МВ II типа, проявляющих высокую чувствительность к анаболическому действию КТ [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты выполнены в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [23]. Животные содержались в помещении кафедры физиологии человека и животных Донецкого национального университета с температурой воздуха 22 °С и 12-часовым циклом свет/темнота, имели свободный доступ к воде и пище. Протокол эксперимента, содержание животных и выведение их из опыта были составлены в соответствии с Европейской конвенцией о защите животных, используемых в эксперименте (директива 86/609/ЕЕС).

Исследования проводились на 40 половозрелых молодых крысах-самках 4-5-ти месячного возраста с исходной массой тела 195–205 г. Животные были первоначально случайным образом разделены на 2 группы: контрольную (n=10, интактная, не подвергалась никаким воздействиям, К-группа) и опытную (n=30, животные получали альфакальцидол, АЛФ). АЛФ (торговая марка «Альфа D3-Тева» производства фирмы Catalent Germany Eberbach GmbH, Германия) вводили ежедневно в дозе 0,06 мкг/кг, перорально на протяжении 10, 30 и 60 дней. Таким образом, опытная группа была в последующем разделена на 3 подгруппы (по 10 животных в каждой) в зависимости от количества полученных инъекций АЛФ: 10АЛФ-, 30АЛФ- и 60АЛФ-группы, что позволило нам исследовать функциональное состояние мышцы в динамике введения препарата.

По окончании сроков введения АЛФ на наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг, внутривенно) проводили острый опыт, в ходе которого изучали электрофизиологические и эргометрические параметры передней большеберцовой мышцы с помощью экспериментальной установки, включающей 3 канала [24, 25]: *канал электростимулятора* (использовался для электрического раздражения малоберцового нерва), *электромиографический* (предназначался для регистрации М-ответов мышцы) и *эргометрический* (служил для измерения высоты, на которую поднимается груз во время сокращения мышцы с грузом).

Канал электростимулятора представлен собственно электростимулятором (построен на основе функционального генератора ICL8038CCDP), оптронной гальванической развязкой и биполярными игольчатыми стальными электродами с межэлектродным расстоянием 1 мм. *Электромиографический канал* представлен отводящими биполярными игольчатыми стальными электродами (с межэлектродным расстоянием 1 мм) и электромиографическим биоусилителем (построен на основе измерительного усилителя INA118). *Эргометрический канал*

включал потенциометрический датчик ПТП-1 с усилителем. Все каналы были связаны с регистрирующим устройством – запоминающим цифровым осциллографом Tektronix (TDS2004C).

У наркотизированного животного препаровали малоберцовый нерв и подводили под него раздражающие электроды стимулятора. Стопу задней лапки с помощью лигатуры крепили к потенциометрическому датчику перемещения, а в среднюю часть передней большеберцовой мышцы вводили игольчатые ЭМГ-электроды с межэлектродным расстоянием 1 мм.

Алгоритм опыта состоял из 6 этапов. На 1-ом этапе опыта регистрировали несколько М-ответов мышцы, которые вызывали сверхпороговыми электрическими импульсами (сила тока – 500 мкА, длительность – 150 мкс каждый и частота – 0,2 имп/с). На основании записей М-ответов мышцы определяли их латентный период, амплитуду и длительность.

На 2-ом этапе в течение 4-х секунд регистрировалась серия из 40 М-ответов при стимуляции импульсами с линейно нарастающей силой тока от 2,5 до 500 мкА (частота – 10 имп/с, длительность импульсов – 150 мкс). На основании процентного изменения амплитуды максимального М-ответа относительно амплитуды минимального определяли приблизительное количество активируемых двигательных единиц (ДЕ) мышцы.

На 3-ем этапе в течение 5 секунд регистрировали одиночные сокращения мышцы с внешней нагрузкой 20 г при стимуляции нерва сверхпороговыми электрическими импульсами с частотой 4 имп/с (сила тока – 500 мкА, длительность – 150 мкс каждый). На основании полученных записей измеряли ряд параметров одиночного сокращения мышцы: амплитуду, латентный период, скорость укорочения и расслабления.

На 4-ом этапе дважды регистрировали сокращение мышцы с внешней нагрузкой 20 г и 70 г. Использовали серию сверхпороговых импульсов с плавно нарастающей частотой от 4 до 70 имп/с (длительность импульса – 50 мкс, сила тока – 1000 мкА). На основании полученных записей определяли максимально достижимую амплитуду тетануса, время и скорость ее достижения.

На 5-ом этапе опыта проводилась регистрация кривой тетанического сокращения мышцы с грузом 70 г в процессе выполнения утомляющей работы (УР). Последнюю индуцировали путем раздражения нерва импульсами силой тока 1000 мкА при частоте 70 имп/с (длительность импульсов – 0,5 мс) вплоть до фактического расслабления мышцы. На основании полученных записей определяли максимальную амплитуду тетанического сокращения мышцы, время ее достижения, мощность сокращения, продолжительность удержания амплитуды сокращения на максимально возможном уровне (период максимальной устойчивой работоспособности мышцы) и до момента полурасслабления (период субмаксимальной работоспособности).

На 6-ом этапе после выполнения мышцей УР вновь регистрировали серии М-ответов при частоте раздражения нерва 0,2 имп/с и при нарастающей силе тока от 2,5 до 500 мкА, а также одиночные сокращения при частоте стимуляции 4 имп/с.

По окончании острого опыта в условиях глубокого наркоза проводили эвтаназию животных путем введения летальной дозы (300 мг/кг) тиопентала натрия.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0. Статистическую значимость различий между двумя средними арифметическими величинами (при условии сохранения нормального закона распределения, W-тест Шапиро-Уилка) определяли с помощью двухвыборочного t-теста Стьюдента для выборок с различными дисперсиями при заданном уровне значимости $p < 0.05$. В общем случае сравнение анализируемых показателей и статистическую оценку различий проводили общепринятыми методами, используемыми в вариационной статистике, на основании проверки нулевой и альтернативной гипотез. Численное значение исследуемых параметров выражали в виде «среднее \pm стандартная ошибка».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изолированное введение АЛФ обусловило увеличение амплитуды М-ответов (на 41–68 % в 10АЛФ-60АЛФ-группах относительно контроля, $p < 0,05$) на фоне их нормальной длительности и отсутствия значимых изменений латентного периода (см. табл. 1). В связи с тем, что увеличение амплитуды М-ответов мышцы наблюдалось на фоне отсутствия значимых изменений их длительности, наиболее вероятной причиной этого увеличения может быть повышение степени синхронизации возбуждения в мышце и возможное увеличение амплитуды потенциала действия (ПД) МВ, в том числе обусловленное их гипертрофией.

Вместе с тем, масса мышцы значимо увеличивалась относительно контроля только спустя 60 дней введения препарата (на 27 %, $p < 0,05$), тогда как амплитуда М-ответа возрастала уже спустя первые 10 дней введения АЛФ. Следовательно, наиболее вероятной причиной увеличения амплитуды М-ответа на начальных этапах введения АЛФ (спустя первые 10–30 дней) является повышение степени синхронизации возбуждения в МВ или амплитуды их ПД.

В пользу способности КТ стимулировать анаболические процессы в МВ особенно гликолитического типа, что может сопровождаться некоторым увеличением массы мышцы, указывают другие исследователи. Так, установлено, что активация VDR в скелетных МВ сопровождается повышением экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 1Ес, выступающего в роли паракринного стимулятора мышечного роста и регенерации мышц при травме [26]. Выявлена способность КТ увеличивать через активацию MAPK-каскада миогенную дифференциацию и пролиферацию, усиливать рост МВ и подавлять активность миостатина – фактора, тормозящего синтез белков в МВ [17], значительно ослаблять экспрессию катаболических маркеров мышечной ткани (атрогина-1 или MuRF1) при СД уже через 2 недели лечения [27]. Все эти факты указывают в пользу способности КТ усиливать анаболизм структурных белков в МВ. И, действительно, некоторые авторы наблюдали увеличение мышечной массы, силы, диаметра и процента мышечных волокон II типа при длительном введении АЛФ [12], а также отмечают положительную корреляцию между уровнем кальцидиола в крови и мышечной массой и силой [26].

Таблица 1

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) параметров М-ответа, количества активируемых двигательных единиц (ДЕ) и массы передней большеберцовой мышцы крыс контрольной группы и животных, получавших альфакальцидол (АЛФ) на протяжении от 10 до 60 дней

Группа животных		Параметры одиночного сокращения			Количество активируемых ДЕ	Масса мышцы, мг
		Латентный период, мс	Амплитуда, мВ	Длительность, мс		
К	исходное значение	1,2±0,05	2,6±0,22	5,5±0,51	14,1±1,21	399,8±6,81
	после УР	1,3±0,06	1,7±0,25 (-36±8,4•)	7,6±0,62 (+38±3,9•)	10,4±0,91 (-26±2,0•)	
10АЛФ	исходное значение	1,3±0,08	3,7±0,38, [+41*]	6,4±0,62	15,8±1,13	404,5±9,12
	после УР	1,5±0,13	2,6±0,28 (-30±7,2•), [+56*]	9,0±0,86 (+41±7,2•)	11,3±1,33 (-28±3,0•)	
30АЛФ	исходное значение	1,3±0,06	4,0±0,38, [+53*]	6,2±0,63	17,1±1,76	399,0±8,70
	после УР	1,5±0,11	2,6±0,29 (-34±7,1•), [+58*]	9,2±0,78 (+48±6,2•)	12,2±1,15 (-28±2,6•)	
60АЛФ	исходное значение	1,3±0,06	4,4±0,44, [+68*]	6,6±0,51	16,2±1,81	509,0±11,3 [+27*]
	после УР	1,4±0,09	3,1±0,34 (-29±6,1•), [+87*]	9,9±0,98 (+50±6,7•)	11,3±1,13 (-30±2,7•)	

Примечание: • – в круглых скобках указана статистически значимая разница показателя после выполнения утомляющей работы (УР) относительно исходного значения соответствующей группы (в %, $p < 0,05$); * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения контрольной группы (в %, $p < 0,05$).

В то же время, в литературе имеются сообщения, согласно которым АЛФ оказался эффективным в плане увеличения мышечной массы только у больных остеопорозом с исходно сниженной мышечной массой [19]. Более того, в некоторых работах установлено, что слишком высокие дозы витамина D, вводимые на протяжении 6 недель, способны вызывать атрофию СМ у старых крыс (27,5 месяцев), затрагивающую преимущественно МВ Пв типа (гликолитические в икроножной мышце), что связано с повышенной экспрессией MuRF-1 без сопутствующего изменения экспрессии инсулиноподобного фактора роста 1, миостатина и интерлейкина 6 [28].

В наших исследованиях получен факт увеличения амплитуды М-ответов СМ уже через 10 дней введения АЛФ, а массы мышцы – спустя 2-х месячный период введения препарата.

Несмотря на увеличение исходной амплитуды М-ответов, изолированное применение АЛФ существенным образом не отразилось на характере изменения параметров М-ответа после выполнения УР в сравнении с контролем. Так,

латентный период М-ответа после выполнения УР у животных АЛФ-групп, подобно контрольным особям, характеризовался некоторой тенденцией к удлинению, которая не имела статистически значимого характера (см. табл. 1). Исходно повышенная относительно контроля амплитуда М-ответа у животных всех АЛФ-групп уменьшалась после УР примерно в такой же степени, как и у контроля (на 30–29 % у крыс 10АЛФ-60АЛФ-групп относительно исходных значений), но оставалась значимо выше соответствующего контрольного значения ($p < 0,05$, см. табл. 1). Аналогично амплитуде длительность М-ответов у крыс АЛФ-групп после УР возрастала примерно в такой же степени, как и у контроля (на 41–50 % у животных 10АЛФ-60АЛФ-групп, см. табл. 1). Количество активируемых ДЕ мышцы у животных АЛФ-групп после УР уменьшалось относительно исходных значений примерно в такой же степени (на 28–30 % у животных 10АЛФ-60АЛФ-групп), как и у контрольных особей (на 26 %, см. табл. 1).

Таким образом, на основании характера изменения параметров М-ответа после выполнения УР относительно исходного уровня у крыс АЛФ-групп нельзя сделать однозначный вывод относительно эффективности АЛФ в повышении устойчивости мышцы к развитию утомления. Для полноты понимания характера влияния длительно вводимого АЛФ на устойчивость мышцы к утомлению необходимо также проанализировать изменение сократительных ее параметров после выполнения УР.

Анализ параметров одиночных сокращений мышцы показал, что изолированное введение АЛФ определенным образом отразилось как на исходных их значениях, так и на характере изменения после выполнения УР.

В частности, спустя первые 10 дней введения АЛФ параметры исходных (до УР) одиночных сокращений мышцы – их амплитуда, латентный период, скорость сокращения и расслабления – значимо не отличались от соответствующих контрольных значений (см. табл. 2). Вместе с тем, у животных 10АЛФ-группы не наблюдалось типичного для контрольных особей уменьшения амплитуды одиночных сокращений после УР, вследствие чего этот параметр после УР превышал соответствующее контрольное значение (на 67 %, $p < 0,05$, см. табл. 2). Кроме того, степень изменения скорости расслабления после выполнения УР у животных 10АЛФ-группы была значимо меньше таковой контроля (см. табл. 2). Данный факт, наряду с отсутствием значимого уменьшения амплитуды одиночных сокращений после УР, типичного для контрольных особей, свидетельствует в пользу более высокой устойчивости мышцы крыс 10АЛФ-группы к утомлению и, возможно, большей скорости ее восстановления после выполнения УР.

По мере дальнейшего введения АЛФ в организм, спустя 30–60 дней его введения, отмеченные особенности изменения параметров одиночного сокращения после УР, типичные для животных 10АЛФ-группы, сохранялись с той лишь разницей, что у крыс 30АЛФ- и 60АЛФ-групп наблюдалось и менее выраженное в сравнении с контролем изменение скорости укорочения после УР (см. табл. 2). Кроме того, спустя 2-х месячный период введения АЛФ имело место увеличение в сравнении с контролем амплитуды исходных одиночных сокращений (на 29 %, $p < 0,05$). Как уже обсуждалось ранее, к данному сроку значимо увеличивалась в сравнении с контролем и масса мышцы (на 27 %, $p < 0,05$, см. табл. 1). Данные факты

могут косвенно свидетельствовать в пользу некоторой гипертрофии МВ под действием длительно вводимого АЛФ.

Таблица 2

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) параметров одиночного сокращения мышцы контрольных животных и крыс, получавших альфакальцидол (АЛФ) на протяжении от 10 до 60 дней

Параметры одиночного сокращения	Группы животных			
	К	10АЛФ	30АЛФ	60АЛФ
Амплитуда одиночного сокращения, мм				
исходная	3,0±0,22	3,5±0,34	3,2±0,26	3,9±0,23, [+29*]
Латентный период одиночного сокращения, мс				
исходный	11,2±0,57	12,3±0,59	12,4±0,68	9,8±0,48
после УР	16,0±0,83 (+43±7,5●)	16,5±0,76 (+34±4,8●)	17,0±1,1 (+37±6,8●)	14,2±1,17 (+44±8,0●)
Скорость укорочения при одиночном сокращении, мм/мс				
исходная	0,10±0,005	0,11±0,006	0,10±0,006	0,13±0,008, [+21*]
после УР	0,09±0,008	0,10±0,009	0,10±0,009	0,12±0,010
Скорость расслабления при одиночном сокращении, мм/мс				
исходная	0,05±0,004	0,06±0,007	0,05±0,007	0,06±0,005
после УР	0,04±0,004	0,06±0,009	0,06±0,009	0,06±0,011

Примечание: ● – в круглых скобках указана статистически значимая разница показателя относительно исходного значения соответствующей группы (в %, $p < 0,05$); * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения контрольной группы (в %, $p < 0,05$).

Таким образом, в наших исследованиях получен факт некоторого улучшения под действием АЛФ способности мышцы к восстановлению после выполнения УР, в пользу чего свидетельствует отсутствие типичного для контроля уменьшения амплитуды одиночных сокращений после УР у животных всех АЛФ-групп. Вместе с тем, как уже обсуждалось ранее, амплитуда М-ответов, в отличие от амплитуды одиночных сокращений, а также количество активируемых ДЕ после УР у животных АЛФ-групп значительно уменьшались относительно исходного уровня, и это уменьшение было аналогичным таковому контроля (см. табл. 1).

Известно, что восстановление мышечной силы после утомления происходит медленнее, чем восстановление возбудимости и амплитуды М-волны, что обусловлено длительным сохранением нарушения сопряжения между возбуждением и сокращением после утомления (в частности, уменьшением выделения кальция из СР в цитозоль) [29]. Наблюдаемое нами отсутствие значимого относительно исходного уровня уменьшения амплитуды одиночных сокращений после УР у животных АЛФ-групп на фоне снижения амплитуды М-ответов указывает в пользу более быстрого, в сравнении с контролем, восстановления у них эффективности сопряжения между возбуждением и

сокращением. В основе более быстрого восстановления эффективности электромеханического сопряжения после утомления под действием АЛФ может лежать способность его активного метаболита КТ индуцировать инфлюкс кальция в МВ в результате как активации ядерного механизма, так и негеномного действия, реализующегося вследствие активации с участием G-белков фосфалипазы D и аденилатциклазы, вызывающих активацию фосфокиназ C и A, обуславливающих стимуляцию высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо (боковых цистерн CP) и активацию потенциалзависимых Ca^{2+} каналов L-типа в плазматической мембране МВ, обуславливающую дополнительный вход кальция в МВ из межклеточных щелей [30]. Установлено также, что вызванное КТ повышение концентрации кальция в миоплазме МВ и культуре миобластов приводит к повышению концентрации связанного с мембранами кальмодулина при одновременном снижении его свободной фракции в цитозоле МВ [30]. Очевидно, какие-то из указанных механизмов действия КТ на выделение кальция в цитозоль МВ обусловили более быструю нормализацию электромеханического сопряжения в МВ животных АЛФ-групп после УР.

Следовательно, некоторое ухудшение после выполнения УР электрофизиологических параметров СМ (в частности, уменьшение амплитуды М-ответа) у животных АЛФ-групп, в отличие от контрольных особей, не отражалось на сократительных параметрах мышцы, что может быть связано с более быстрой нормализацией электромеханического сопряжения в их МВ.

Литературные данные относительно влияния АЛФ на устойчивость СМ к утомлению противоречивы. Если одни авторы [31] указывают в пользу эффективности АЛФ в поддержании нормальной силы мышц и их способности выдерживать нагрузки, то другие [13] отмечают его позитивный эффект на данные параметры только в случае исходного дефицита в организме, а третьи [32] – не выявили существенного влияния длительного (в течение 1 месяца) введения АЛФ на мышечную утомляемость у крыс, тогда как увеличение максимальной силы икроножной мышцы имело место.

Таким образом, в наших экспериментах получены факты значимого увеличения амплитуды одиночных сокращений мышцы спустя 60 дней введения АЛФ, сочетавшегося с увеличением мышечной массы, а также более быстрого восстановления сократительных параметров СМ после УР в сравнении с контролем. Вместе с тем, для более детальной оценки сократительной функции мышцы животных всех групп на заключительном этапе наших исследований мы сочли необходимым оценить параметры тетанического сокращения мышцы, которое она зачастую развивает в реальных условиях при необходимости развить достаточную для выполнения внешней работы мощность.

Для этого проводили регистрацию кривых сокращения мышцы (эргограмм) в условиях 6-ти секундных тетанусов с внешними нагрузками 20 г и 70 г, а также в момент выполнения мышцей УР в режиме гладкого тетануса с внешней нагрузкой 70 г вплоть до полного расслабления мышцы на фоне продолжающейся стимуляции.

Анализ параметров 6-ти секундных тетанических сокращений мышцы при малых (20 г) и больших (70 г) нагрузках показал следующее. Длительное изолированное

применение АЛФ существенно не повлияло на амплитуду тетануса при малой внешней нагрузке (20 г), но привело к существенному увеличению в сравнении с контролем скорости развития тетанического сокращения (на 58–63 % у животных 30АЛФ- и 60АЛФ-групп в сравнении с контролем, $p < 0,05$, см. табл. 3). При работе мышцы с большей внешней нагрузкой (70 г) наблюдалось значимое относительно контроля увеличение амплитуды тетануса у животных 60АЛФ-группы (на 25 %, $p < 0,05$) и существенное увеличение скорости развития тетануса (на 42–110 % у особей 30АЛФ-60АЛФ-групп относительно контроля, $p < 0,05$, см. табл. 3). Более того, уже спустя первые 10 дней введения АЛФ отмечалась выраженная тенденция к увеличению скорости развития тетануса при внешней нагрузке 70 г, достигавшая значимого характера спустя месяц ежедневного введения АЛФ (см. табл. 3). Кроме того, у животных 60АЛФ-группы процентное отношение скорости развития тетануса при нагрузке в 70 г к таковой при нагрузке в 20 г значимо превосходило ($p < 0,05$) соответствующее контрольное значение (см. табл. 3).

В целом, наблюдаемое нами увеличение скорости развития тетанического сокращения у животных 30АЛФ- и 60АЛФ-групп как при малой (20 г), так и при большей (70 г) нагрузке может отражать увеличение степени синхронизации возбуждения и сокращения МВ и отчасти быть обусловлено улучшением электромеханического сопряжения в них благодаря способности АЛФ увеличивать инфлюкс кальция в цитозоль МВ при возбуждении [30]. В то же время, наблюдаемое нами у животных 60АЛФ-группы увеличение в сравнении с контролем процентного отношения скорости развития тетануса при нагрузке в 70 г относительно таковой в 20 г косвенно свидетельствует в пользу не только улучшения электромеханического сопряжения в МВ, как одной из причин ускорения тетануса, но и в пользу увеличения силовых характеристик исследуемой мышцы.

Таблица 3

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) амплитуды и скорости развития тетанического сокращения мышцы контрольных животных и крыс, получавших альфакальцидол (АЛФ) на протяжении от 10 до 60 дней, при внешних нагрузках 20 г и 70 г

Группа животных	Внешняя нагрузка – 20 г		Внешняя нагрузка – 70 г		Изменение скорости тетануса при нагрузке 70 г относительно таковой при нагрузке 20 г, %
	амплитуда тетануса, мм	скорость развития тетануса, мм/с	амплитуда тетануса, мм	скорость развития тетануса, мм/с	
Контроль	15,6±1,14	5,9±0,39	13,8±1,13	4,8±0,32	-20,0±4,19
10АЛФ	15,5±1,15	7,8±0,76	14,0±1,06	5,8±0,43	-24,7±4,56
30АЛФ	17,9±1,12	9,4±1,08, [+58*]	16,3±0,96	6,7±0,59, [+42*]	-28,4±4,29
60АЛФ	18,0±0,98	9,7±0,84, [+63*]	17,3±0,86, [+25*]	10,0±0,93, [+110*]	3,1±0,22*

Примечание: * – различия статистически значимы относительно соответствующего значения контрольной группы ($p < 0,05$).

При работе мышцы с внешней нагрузкой 70 г вплоть до полного ее расслабления на фоне продолжающейся электрической стимуляции малоберцового нерва выявлены следующие эффекты АЛФ на параметры тетанического сокращения мышцы при выполнении ею УР. Длительное введение АЛФ обусловило некоторое улучшение временных параметров тетанического сокращения мышцы. В частности, спустя 30 дней ежедневного введения АЛФ наблюдалась некоторая тенденция к увеличению максимально достижимой амплитуды тетануса, не достигавшая значимого относительно контроля уровня, но обусловившая увеличение мощности сокращения (на 39 %, $p < 0,05$, см. табл. 4). По окончании 2-х месячного периода введения АЛФ имело место значимое в сравнении с контролем увеличение амплитуды тетануса (на 28 %, $p < 0,05$), которое обусловило еще большее увеличение мощности тетанического сокращения (на 48 %, $p < 0,05$ относительно контроля), чем у животных 30АЛФ-группы (см. табл. 4). Как уже обсуждалось ранее, при анализе 6-ти секундных тетанусов с внешней нагрузкой 20 и 70 г также было выявлено увеличение скорости развития тетануса в 30АЛФ- и 60АЛФ-группах (см. табл. 3). Кроме того, по окончании 2-х месячного периода введения АЛФ наблюдалось также значимое в сравнении с контролем увеличение продолжительности периода максимальной устойчивой работоспособности мышцы (на 57 %, $p < 0,05$ относительно контроля, см. табл. 4).

Таким образом, длительное изолированное введение АЛФ (на протяжении 30–60 дней) обусловило как увеличение скорости развития тетануса и соответственно его мощности, так и удлинение периода максимальной устойчивой работоспособности мышцы, косвенно свидетельствующее в пользу повышения ее устойчивости к утомлению.

Таблица 4

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) силовых и временных параметров тетанического сокращения мышцы контрольных животных и крыс, получавших альфакальцидол (АЛФ) на протяжении от 10 до 60 дней

Группа крыс	Амплитуда тетанического сокращения, мм	Время достижения максимальной амплитуды сокращения, с	Мощность тетанического сокращения, мВт	Длительность удержания максимальной амплитуды тетанического сокращения, с	Длительность снижения амплитуды сокращения на 50% относительно максимальной, с
Контроль	13,4±1,17	0,8±0,13	11,1±0,96	3,6±0,39	9,1±1,08
10АЛФ	13,1±1,19	0,7±0,11	13,1±1,28	3,6±0,28	8,4±0,97
30АЛФ	14,6±1,29	0,7±0,10	15,4±1,3, [+39*]	4,0±0,55	8,7±0,73
60АЛФ	17,1±1,0, [+28*]	0,7±0,09	16,4±1,8, [+48*]	5,7±0,5, [+57*]	10,0±0,95

Примечание: * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно контрольной группы (в %, $p < 0,05$).

Подводя итог характеру влияния АЛФ на функциональное состояние СМ смешанного типа с преобладанием гликолитических МВ, необходимо отметить следующие факты. Во-первых, АЛФ спустя 60 дней введения обусловил значимое в сравнении с контролем ($p < 0,05$) увеличение амплитуды одиночного (на 29 %) и тетанического (на 25–28 %) сокращений мышцы на фоне увеличения ее массы (на 27 %). Кроме этого, к данному сроку улучшались и силовые характеристики мышцы, в пользу чего свидетельствует значимо большее в сравнении с контролем ($p < 0,05$) отношение скорости развития тетануса при большей внешней нагрузке (70 г) относительно таковой при меньшей внешней нагрузке (20 г). Во-вторых, уже спустя 30 дней введения АЛФ наблюдалось улучшение относительно контроля скоростных характеристик мышцы, в пользу чего указывает увеличение скорости развития тетануса как при малых (на 58 %), так и больших внешних нагрузках (на 42 %), а также мощности тетанического сокращения (на 48 %). Данные факты отражают увеличение под влиянием длительно вводимого АЛФ степени синхронизации возбуждения и сокращения в МВ, отчасти обусловленное улучшением электромеханического сопряжения в них. В-третьих, спустя 60 дней ежедневного введения АЛФ наблюдалось значимое в сравнении с контролем ($p < 0,05$) увеличение продолжительности периода максимальной работоспособности мышцы (на 57 %), и уже после первых 10 дней введения АЛФ – более быстрое восстановление сократительных параметров мышцы после выполнения УР, обусловленное, вероятнее всего, более быстрым восстановлением эффективности сопряжения между возбуждением и сокращением в МВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами в модельных экспериментах на животных факты некоторого улучшения амплитудных и скоростных параметров сокращения СМ под влиянием длительно вводимого АЛФ (на протяжении 1–2-х месяцев) в умеренной фармакологической дозе (0,06 мкг/кг), а также повышения ее устойчивости к утомлению и более быстрого восстановления сократительных параметров мышцы после утомляющей работы, позволяют рассматривать АЛФ как одно из потенциальных средств, способных улучшить состояние нервно-мышечного аппарата не только в патологии, как указывает ряд авторов, но и в норме.

Список литературы

1. Крюкова И. В. Возможности альфакальцидола в профилактике и лечении различных форм остеопороза / И. В. Крюкова. – Российский медицинский журнал (РМЖ). – 2016. – № 20. – С. 1359–1363.
2. Combs F. G. Jr. (ed.). The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. / Combs F. G. Jr. – 3rd ed. Amsterdam-Boston: Elsevier Academic Press, 2008. – 584 p.
3. Казюлин А. Н. Витамин D: монография / А. Н. Казюлин. – М.: ГОУ НТЦ АМТ, 2007 – 106 с.
4. Древаль А. В. Внекостные эффекты витамина D (обзор литературы) / Древаль А. В., Крюкова И. В., Барсуков И. А., Тевосян Л. Х. // Российский медицинский журнал (РМЖ). – 2017. – №1. – С. 53–56.
5. Azizieh F. Association between levels of vitamin D and inflammatory markers in healthy women / F. Azizieh, K. O. Alyahya, R. Raghupathy // J. Inflamm. Res. – 2016. – № 9. – P. 51–57.

6. Салухов В. В. Костные и внекостные эффекты витамина D, а также возможности медикаментозной коррекции его дефицита / В. В. Салухов, Е. А. Ковалевская, В. В. Курбанова // Медицинский совет. – 2018. – № 4. – С. 90–99.
7. Zheng J. S. Circulating 25-Hydroxyvitamin D, IRS1 variant rs2943641, and insulin resistance: replication of a gene-nutrient interaction in 4 populations of different ancestries / Zheng J. S., Parnell L. D., Smith C. E., Lee Y. C., Jamal-Allial A., Ma Y., D. Li, K. L. Tucker, J. M. Ordovás, Ch.-Q. Lai // Clin. Chem. – 2014. – V. 60, №1. – P. 186–196.
8. Vaidya A. Vitamin D and insulin sensitivity: Can gene association and pharmacogenetic studies of the vitamin d receptor provide clarity? / A. Vaidya, J. S. Williams // Metabolism. – 2012. – V. 61, №6. – P. 759–761.
9. Schacht E. The therapeutic effects of alfacalcidol on bone strength, muscle metabolism and prevention of falls and fractures / E. Schacht, F. Richy, J.-Y. Reginster // J. Musculoskelet. Neuronal. Interact. – 2005. – V. 5, №3. – P. 273–284.
10. Judd S. E. Vitamin D deficiency and incident stroke risk in community-living black and white adults / S. E. Judd, C. J. Morgan, B. Panwar, V. J. Howard, V. G. Wadley, N. S. Jenny, B. M. Kissela, O. M. Gutiérrez // Int. J. Stroke. – 2016. – V. 11, №1. – P. 93–102.
11. Громова О. А. Полногеномный анализ сайтов связывания рецептора витамина D / О. А. Громова, И. Ю. Трошин, В. Б. Спиричев // Медицинский совет. – 2016. – № 1. – С. 12–21.
12. Stockton K. A. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: a systematic review and meta-analysis / K. A. Stockton, K. Mengersen, J. D. Paratz, D. Kandiah, K. L. Bennell // Osteoporos. Int. – 2011. – Vol. 22. – P. 859–871
13. Capatina C. Short-term Administration of Alphacalcidol is Associated with More Significant Improvement of Muscular Performance in Women with Vitamin D Deficiency Compared to Native Vitamin D / C. Capatina, A. Carageorghopol, M. Berteanu, C. Poiana // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. – 2016. – V. 124, №8. – P. 461–465.
14. Peterlik M. Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: molecular and cellular pathophysiology / M. Peterlik, H. S. Cross // Eur. J. Clin. Nutr. – 2009. – V. 63, №12. – P. 1377–1386.
15. Heidari B. Association between nonspecific skeletal pain and vitamin D deficiency / B. Heidari, J. S. Shirvani, A. Firouzjahi, P. Heidari, K. O. Hajian-Tilaki // Int. J. Rheum. Dis. – 2010. – V. 13, №4. – P. 340–346.
16. Ceglia L. Vitamin D and its role in skeletal muscle / L. Ceglia // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2009. – Vol. 12, №6. – P. 628–633
17. Gröber U. Vitamin D – Die Heilkraft des Sonnenvitamins / U. Gröber, M. F. Holick // Zeitschrift. für Orthomolekulare Medizin. – 2020. – T. 18, №02. – P. 30–31.
18. Barker T. Supplemental vitamin D enhances the recovery in peak isometric force shortly after intense exercise / T. Barker, E. D. Schneider, B. M. Dixon, V. T. Henriksen, L. K. Weaver // Nutr. Metab. (Lond). – 2013. – V. 10, №1. – P. 69.
19. Ito S. Use of alfacalcidol in osteoporotic patients with low muscle mass might increase muscle mass: an investigation using a patient database / S. Ito, A. Harada, T. Kasai, Y. Sakai, M. Takemura, Y. Matsui, T. Hida, N. Ishiguro // Geriatr. Gerontol. Int. – 2014. – V. 14, № 1. – P. 122–128
20. Hara S. Effects of alfacalcidol on back extensor strength gained through back extensor exercise in postmenopausal women with osteoporosis / S. Hara, K. N. Kishimoto, H. Okuno, M. Tanaka, H. Saito, A. Oizumi, E. Itoi // Am. J. Phys. Med. Rehabil. – 2013. – V. 92, №2. – P. 101–110.
21. Janssen H. C. Vitamin D deficiency, muscle function, and falls in elderly people / H. C. Janssen, M. M. Samson, H. J. Verhaar // Am. J. Clin. Nutr. – 2002. – V. 75, №4. – P. 611–615.
22. Vervloet M. Clinical uses of 1-alpha-hydroxycholecalciferol / M. Vervloet // Curr. Vasc. Pharmacol. – 2014. – V. 12, №2. – P. 300–305.
23. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / Миронова А. Н., Бунатян Н. Д., ред. Москва: Минздрав РФ, ЗАО «Гриф и К», 2012. – 944 с.
24. Труш В. В. Сравнительная оценка влияния длительно вводимого адреналина и селективного β 2-адреноагониста формотерола на функциональное состояние скелетной мышцы белых крыс / В. В. Труш, В. И. Соболев // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2018. – Т. 4(70), №1. – С. 118–136.

25. Труш В. В. Оценка эффективности β_2 -адреноагониста формотерола в компенсации электрофизиологических проявлений стероидной миопатии в модельных экспериментах на животных / В. В. Труш, В. И. Соболев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Том. 63, № 3. – С. 35–47.
26. Hamilton B. Vitamin D and human skeletal muscle / B. Hamilton // Scand. J. Med. Sci. Sports. – 2010. – V. 20, № 2. – P. 182–190.
27. Akagawa M. Effects of activated vitamin D, alfacalcidol, and low-intensity aerobic exercise on osteopenia and muscle atrophy in type 2 diabetes mellitus model rats / M. Akagawa, N. Miyakoshi, Y. Kasukawa, Y. Ono, Y. Yuasa, I. Nagahata, C. Sato, H. Tsuchie, H. Nagasawa, M. Hongo, Y. Shimada // PLoS One. – 2018. – V. 13, №10. – P. e0204857.
28. Testerink J. Effects of alfacalcidol on circulating cytokines and growth factors in rat skeletal muscle / J. Testerink, R. T. Jaspers, J. Rittweger, A. de Haan, H. Degens // J. Physiol Sci. – 2011. – V. 61, №6. – P. 525–535.
29. MacIntosh B. R. Skeletal Muscle: Form and Function. / MacIntosh B. R., Gardiner P. F., McComas A. J. – Champaign: Human Kinetics, 2006. – 423 p.
30. Vazquez G. Involvement of calmodulin in 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulation of store-operated Ca²⁺ influx in skeletal muscle cells / G. Vazquez, A. R. de Boland, R. Boland // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275, №21. – P. 16134–16138.
31. Pludowski P. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality – a review of recent evidence / P. Pludowski, M. F. Holick, S. Pilz, C. L. Wagner, B. W. Hollis, W. B. Grant, Y. Shoenfeld, E. Lerchbaum, D. J. Llewellyn, K. Kienreich, M. Soni // Autoimmun. Rev. – 2013. – V. 12, №10. – P. 976–989.
32. Kasukawa Y. Effects of alfacalcidol on muscle strength, muscle fatigue, and bone mineral density in normal and ovariectomized rats / Y. Kasukawa, N. Miyakoshi, S. Maekawa, K. Nozaka, H. Noguchi, Y. Shimada // Biomed. Res. – 2010. – V. 31, №5. – P. 273–279.

EVALUATION IN EXPERIMENTS ON ANIMALS OF THE EFFECTS OF LONG-TERM ADMINISTRATION OF ALPHACALCIDOL ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE SKELETAL MUSCLE

Trush V. V.¹, Sobolev V. I.²

¹*Donetsk national university, Donetsk, Ukraine*

²*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*

E-mail: ver.trush@yandex.ru

The aim of the research was to study the functional parameters of skeletal muscle of the mixed type with a predominance of glycolytic fibers (*m. tibialis anterior*) in the dynamics of administration of alfacalcidol (ALF) in a medium pharmacological dose (0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of 10 to 60 days in experiments on animals.

Methods. The experiments were performed on sexually mature female rats (of 4–5 months of age), initially divided into 2 groups: control (n=10, C-group) and experimental (n=30, ALF-group), animals of which received alfacalcidol (ALF, "Alpha D3-Teva", Catalent Germany Eberbach GmbH, Germany) at a dose of 0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (daily, orally) for 10, 30 and 60 days. Thus, the experimental group was subsequently divided into 3 subgroups (n=10 in each), each of which received ALF during different time intervals: 10 (10ALF-group), 30 (30ALF-group) and 60 (60ALF-group) days.

At the end of the ALF administration on anesthetized animals (sodium thiopental, 100 mg/kg, intraperitoneally) an acute experiment some functional parameters of the tibialis anterior muscle were studied using the stimulation electromyography and myography methods under conditions of induced excitation and contraction of the muscle, which were induced by stimulation of the fibular nerve with a suprathreshold electric current.

Results. It was found that ALF after 60 days of administration caused a significant increase of the amplitude of single (by 29 %) and tetanic (by 25–28 %) muscle contractions in comparison with the control ($p < 0,05$) against the background of an increase in its mass (by 27 %). Moreover, the strength characteristics of the muscle improved by this time, which is evidenced by the significantly higher ratio of the rate of development of tetanus with a greater external load (70 g) relative to that with a lower external load (20 g). Already after 30 days of ALF administration, an improvement of the speed characteristics of the muscle relative to the control was observed, which is indicated by an increase in the rate of development of tetanus both at low (by 58 %) and large external loads (by 42 %), as well as by the power of tetanic contraction (by 48 %). These facts reflect an increase in the degree of synchronization of excitation and contraction in muscle fibers under the influence of long-term administration of ALF, partly due to an improvement in the electromechanical coupling in them. After 60 days of daily administration of ALF, a significant increase in the duration of the period of maximum muscle performance (by 57 %) was observed in comparison with the control ($p < 0,05$), and after the first 10 days of administration of ALF was observed a faster recovery of the contractile parameters of the muscle after performing fatiguing work, most likely due to a more rapid recovery of the efficiency of the coupling between excitation and contraction in muscle fibers.

Conclusion. Obtained in model experiments on animals, the facts of some improvement of the amplitude and speed parameters of skeletal muscle contraction under the influence of long-term administration of ALF (for 1–2 months) in a medium pharmacological dose (0,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$), as well as an increase in its resistance to fatigue and faster recovery of the contractile parameters of the muscle after fatiguing work, allow us to consider ALF as one of the potential means that can improve the state of the neuromuscular apparatus not only in pathology, but also in normal conditions.

Keywords: skeletal muscle, vitamin D, alfacalcidol, calcitriol, rats.

References

1. Kryukova I. V. Alfacalcidol for the prevention and treatment of osteoporosis, *Rossiiskij medicinskij zhurnal (Russian medical journal)*, **20**, 1359 (2016) (In Russian)
2. Combs F. G. Jr. (ed.). *The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health*. (3rd ed., Amsterdam-Boston: Elsevier Academic Press, 2008).
3. Kazyulin A. N. Vitamin D: monograph. (Moscow: GOU NTC AMT, 2007) (In Russian)
4. Dreval' A. V., Kryukova I. V., Barsukov I. A., Tevosyan L. H. The extra-osseous effects of vitamin D (literature review), *Rossiiskij medicinskij zhurnal (Russian medical journal)*, **1**, 53 (2017) (In Russian)
5. Azizieh F., Alyahya K. O., Raghupathy R. Association between levels of vitamin D and inflammatory markers in healthy women, *J. Inflamm. Res.*, **9**, 51 (2016). DOI: <https://doi.org/10.2147/jir.s103298>

6. Salukhov V. V., Kovalevskaya E. A., Kurbanova V. V. Osteal and extraosteal effects of vitamin D and its opportunities of medication correction of its deficiency, *Meditsinskiy sovet (Medical council)*, 4, 90 (2018). DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-4-90-99>. (In Russian)
7. Zheng J. S., Parnell L. D., Smith C.E., Lee Y.C., Jamal-Allial A., Ma Y., Li D., Tucker K. L., Ordovás J. M., Lai Ch.-Q. Circulating 25-Hydroxyvitamin D, IRS1 variant rs2943641, and insulin resistance: replication of a gene-nutrient interaction in 4 populations of different ancestries, *Clin. Chem.*, **60** (1), 186 (2014). DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.215251>
8. Vaidya A., Williams J. S. Vitamin D and insulin sensitivity: Can gene association and pharmacogenetic studies of the vitamin d receptor provide clarity? *Metabolism*, 61 (6), 759 (2012). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.12.009>
9. Schacht E., Richey F., Reginster J-Y. The therapeutic effects of alfacalcidol on bone strength, muscle metabolism and prevention of falls and fractures, *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, **5** (3), 273 (2005).
10. Judd S.E., Morgan C. J., Panwar B., Howard V. J., Wadley V. G., Jenny N. S., Kissela B. M., Gutiérrez O. M. Vitamin D deficiency and incident stroke risk in community-living black and white adults. *Int. J. Stroke*, **11** (1), 93 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1177/1747493015607515>
11. Gromova O. A., Troshin I. Yu., Spirichev V. B. Genome-wide view of vitamin D receptor binding sites. *Meditsinskiy Sovet (Medical council)*, 1, 12 (2016). (In Russian)
12. Stockton K. A., Mengersen K., Paratz J.D. Kandiah D., Bennell K.L. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: a systematic review and meta-analysis, *Osteoporos. Int.*, 22, 859 (2011). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1407-y>
13. Capatina C., Caragheorgeopol A., Berceanu M., Poiana C. Short-term Administration of Alphacalcidol is Associated with More Significant Improvement of Muscular Performance in Women with Vitamin D Deficiency Compared to Native Vitamin D, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **124** (8), 461 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0042-103932>
14. Peterlik M., Cross H. S. Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: molecular and cellular pathophysiology, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **63** (12), 1377 (2009). DOI: <https://doi.org/10.1038/ejen.2009.105>
15. Heidari B., Shirvani J. S., Firouzjahi A., Heidari P., Hajian-Tilaki K. O. Association between nonspecific skeletal pain and vitamin D deficiency. *Int. J. Rheum. Dis.*, **13** (4), 340 (2010). DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1756-185x.2010.01561.x>
16. Ceglia L. Vitamin D and its role in skeletal muscle, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **12** (6), 628 (2009). DOI: <https://doi.org/10.1097/mco.0b013e328331c707>
17. Gröber U., Holick M. F. Vitamin D – Die Heilkraft des Sonnenvitamins. *Zeitschrift für Orthomolekulare Medizin*, **18** (02), 30 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1207-4076>
18. Barker T., Schneider E. D., Dixon B. M., Henriksen V. T., Weaver L. K. Supplemental vitamin D enhances the recovery in peak isometric force shortly after intense exercise. *Nutr. Metab. (Lond.)*, **10** (1), 69 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-69>
19. Ito S., Harada A., Kasai T., Sakai Y., Takemura M., Matsui Y., Hida T., Ishiguro N. Use of alfacalcidol in osteoporotic patients with low muscle mass might increase muscle mass: an investigation using a patient database, *Geriatr. Gerontol. Int.*, 14 (1), 122 (2014). DOI: <https://doi.org/10.1111/ggi.12222>
20. Hara S., Kishimoto K. N., Okuno H., Tanaka M., Saito H., Oizumi A., Itoi E. Effects of alfacalcidol on back extensor strength gained through back extensor exercise in postmenopausal women with osteoporosis, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, **92** (2), 101 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e31826ed991>
21. Janssen H. C., Samson M. M., Verhaar H. J. Vitamin D deficiency, muscle function, and falls in elderly people, *Am. J. Clin. Nutr.*, **75** (4), 611 (2002). DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.4.611>
22. Vervloet M. Clinical uses of 1-alpha-hydroxycholecalciferol, *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **12** (2), 300 (2014). DOI: <https://doi.org/10.2174/15701611113119990132>
23. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv (Guidelines for conducting preclinical studies of medicines)*, A. N. Mironova, N. D. Bunatyan, eds. Moscow: Minzdrav RF, ZAO «Grif i K»; 2012. (In Russian)
24. Trush V. V., Sobolev V. I. Comparative assessment of the influence of long-term administration of adrenaline and selective β_2 -adrenoagonist formoterol on the functional condition of the skeletal muscle of

- white rats, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. – Series: Biology, Chemistry*, **4** (70), 118 (2018). (In Russian).
25. Trush V. V., Sobolev V. I. Beta-2-adrenergic agonist formoterol efficiency evaluation in compensation of the electrophysiological manifestations of steroid myopathy in model experiments on the animals, *Pathological physiology and experimental therapy*, **63** (3), 35 (2019). (In Russian). DOI: <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2019.03.35-47>
 26. Hamilton B. Vitamin D and human skeletal muscle, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **20** (2), 182 (2010). DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.01016>.
 27. Akagawa M., Miyakoshi N., Kasukawa Y., Ono Y., Yuasa Y., Nagahata I., Sato C., Tsuchie H., Nagasawa H., Hongo M., Shimada Y. Effects of activated vitamin D, alfacalcidol, and low-intensity aerobic exercise on osteopenia and muscle atrophy in type 2 diabetes mellitus model rats, *PLoS One*, **13** (10), e0204857 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204857>
 28. Testerink J., Jaspers R. T., Rittweger J., de Haan A., Degens H. Effects of alfacalcidol on circulating cytokines and growth factors in rat skeletal muscle, *J. Physiol. Sci.*, **61** (6), 525 (2011). DOI: <https://doi.org/10.1007/s12576-011-0174-7>
 29. MacIntosh B. R., Gardiner P. F., McComas A. J. *Skeletal Muscle: Form and Function*. – Champaign: Human Kinetics, 2006. – 423 p. DOI: <https://doi.org/10.5040/9781492596912>
 30. Vazquez G., de Boland A. R., Boland R. Involvement of calmodulin in 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulation of store-operated Ca²⁺ influx in skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.*, **275** (21), 16134 (2000). DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.c901008199>
 31. Pludowski P., Holick M. F., Pilz S., Wagner C. L., Hollis B. W., Grant W. B., Shoenfeld Y., Lerchbaum E., Llewellyn D. J., Kienreich K., Soni M. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality – a review of recent evidence, *Autoimmun. Rev.*, **12** (10), 976 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.02.004>
 32. Kasukawa Y., Miyakoshi N., Maekawa S., Nozaka K., Noguchi H., Shimada Y. Effects of alfacalcidol on muscle strength, muscle fatigue, and bone mineral density in normal and ovariectomized rats, *Biomed. Res.*, **31** (5), 273 (2010). DOI: <https://doi.org/10.2220/biomedres.31.273>