

УДК 591.182: 612.015.6/.018: 612.454: 612.741: 57.084.1

МОДУЛЯЦИЯ АЛЬФАКАЛЬЦИДОЛОМ НЕКОТОРЫХ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ СТЕРОИДНОЙ МИОПАТИИ В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА ЖИВОТНЫХ

Труш В. В.¹, Соколов В. И.²

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

²*Гуманитарно-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 установлено, что комплексное введение дексаметазона (ДМ) и альфакальцидола (АЛФ) предотвратило типичное для ДМ-группы развитие исходной заблокированности синапсов и частично ослабило повышенную утомляемость мышечных волокон. Вместе с тем, у особей ДМ+АЛФ-группы обнаруживалась признаки постсинаптических нарушений и сниженной лабильности синапсов. Введение АЛФ в комплексе с ДМ, хоть и предотвратило типичное для ДМ-группы появление патологически значимого декремента амплитуды М-ответов при низкой частоте стимуляции нерва (4 имп/с) до утомляющей работы, но у 30 % особей ДМ+АЛФ-группы после утомления он все же регистрировался, что свидетельствует в пользу более низкой, в сравнении с контролем, надежности и, возможно, более высокой утомляемости синапсов. В целом, частичные позитивные эффекты АЛФ в компенсации негативного влияния длительно вводимого ДМ на состояние синаптического звена позволяют рассматривать его как одно из возможных средств для ослабления стероидной миопатии.

Ключевые слова: скелетная мышца; дексаметазон; ятрогенный гиперкортицизм; стероидная миопатия; альфакальцидол.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что терапия глюкокортикоидами (ГК), особенно длительная, сопровождается побочными патологическими изменениями в ряде структур организма, в том числе в нервно-мышечном аппарате (НМА) [1].

Патологические изменения в НМА при гиперкортицизме характеризуются большой сложностью и включают не только дистрофические изменения мышечных волокон (МВ) [2, 3], но и электрофизиологические нарушения собственно МВ [4], синаптического звена [5, 6] и возможно мотонейронов [7–9]. Более того, исследованиями ученых казанской научной школы [10] показано, что в основе снижения мышечной силы под влиянием ГК могут лежать не только длительно развивающиеся структурные и метаболические перестройки в НМА, но и быстро реализующиеся вследствие негеномных их эффектов изменения синаптической передачи.

Вместе с тем, влияние фармакологических доз ГК на синаптический аппарат носит дискуссионный характер и, по мнению разных специалистов, может

затрагивать различные его структуры: пресинаптический полюс [11], активность холинэстеразы [5, 6, 12] и постсинаптическое звено [13].

При этом определенные электрофизиологические нарушения при гиперкортицизме не всегда сопровождаются выраженными функциональными расстройствами. Так, некоторые специалисты отмечают возможное отсутствие выраженного ухудшения сократительной функции скелетных мышц (СМ) при наличии электрофизиологических нарушений [9, 14] и даже улучшение мышечной силы, несмотря на снижение возбудимости МВ и скорости проведения возбуждения по ним под влиянием фармакологических доз ГК [4]. В связи с этим электрофизиологические нарушения СМ при ГК-терапии служат достаточно показательным отражением стероидной миопатии.

Учитывая сложность и разнообразие возможных механизмов стероидной миопатии, до сих пор в литературе не встречается однозначных данных о способах ее коррекции. В качестве возможного средства для ослабления стероидной миопатии некоторые специалисты рассматривают витамин D. Так, в исследовании Miyakoshi N. и соавт. [15] показана эффективность витамина D в предотвращении уменьшения силы и объема мышц крыс, получавших в течение месяца преднизолон. В то же время, оценки электрофизиологических параметров СМ в этой работе не проводилось. Между тем, как уже было отмечено ранее, в основе снижения мышечной силы под влиянием фармакологических доз ГК могут лежать не только мышечная атрофия, но и функциональные изменения в НМА, возможно реализующиеся негеномным путем и затрагивающие синаптическое звено [10]. Соответственно предотвращение только лишь мышечной атрофии может не обеспечить полной компенсации мышечных расстройств, характерных для гиперкортицизма.

В связи с этим становится очевидным, что для полноценной оценки эффективности витамина D и его производных в компенсации стероидной миопатии необходимо изучение не только силовых, но и электрофизиологических параметров СМ, в том числе состояния синаптического аппарата.

Учитывая данные относительно дефицита витамина D в организме [16] и понижения чувствительности периферических тканей к его активному метаболиту кальцитриолу [17] при гиперкортицизме, а также факты снижения синтеза мышечных белков, дегенеративных изменений МВ и усиления их апоптоза при дефиците витамина D [18, 19], в качестве рабочей гипотезы в настоящей работе мы выдвинули предположение относительно эффективности частично активированного метаболита витамина D – альфакальцидола (АЛФ) – в компенсации стероидной миопатии.

При этом использование для компенсации стероидной миопатии именно АЛФ, а не витамина D или его гормонально активного метаболита кальцитриола, было обусловлено двумя обстоятельствами. Во-первых, в отличие от витаминов D₂ и D₃, АЛФ превращается в гормонально активную форму – кальцитриол – в результате однократного гидроксирования в различных структурах организма [20], что важно при длительной ГК-терапии, сопровождающейся снижением активности 25α-гидроксилазы печени и соответственно нарушением образования кальцидиола

и кальцитриола в организме даже при достаточном экзогенном поступлении витамина D [16]. Во-вторых, АЛФ в отличие от кальцитриола более безопасен в плане возможного развития гиперкальциемии [21].

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы явилось изучение в модельных экспериментах на крысах эффективности альфакальцидола (0,06 мкг/кг/сутки) в компенсации электрофизиологических проявлений стероидной миопатии, индуцированной длительным введением дексаметазона (0,25 мг/кг/2-е суток, на протяжении 30 дней). В качестве объекта исследования была выбрана передняя большеберцовая мышца, характеризующаяся существенным преобладанием гликолитических волокон, проявляющих гораздо более высокую, в сравнении с оксидативными волокнами, чувствительность к катаболическому действию ГК [22].

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). Работа одобрена этическим комитетом университета.

Исследования проводились на 40 половозрелых молодых крысах-самках 4–5-ти месячного возраста с исходной массой тела 195–205 г. Выбор особей женского пола в качестве объекта исследования был обусловлен большей их чувствительностью, в сравнении с особями мужского пола, к катаболическому действию ГК. Животные были случайным образом разделены на 4 группы: контрольную (интактная, не подвергались никаким воздействиям, К-группа, n=10), I опытную (получали дексаметазон, ДМ-группа, n=10), II опытную (получали дексаметазон в комплексе с альфакальцидолом, ДМ+АЛФ-группа, n=10) и III опытную (получали альфакальцидол, АЛФ-группа, n=10). Препараты вводили в дозах, адекватных терапевтическим для человека, на протяжении 30 дней: дексаметазон (KRKA, Словения) – в дозе 0,25 мг/кг, 1 раз в 2-е суток, внутривентриально, альфакальцидол (торговая марка «Альфа D3-Тева» производства фирмы Catalent Germany Eberbach GmbH, Германия) – в дозе 0,06 мкг/кг, ежедневно, перорально.

По окончании срока введения препаратов на наркотизированных животных (тиопентал натрия, 100 мг/кг, внутривентриально) проводили острый опыт, в ходе которого с помощью метода стимуляционной электромиографии регистрировали серии М-ответов передней большеберцовой мышцы (*m. tibialis anterior*) при разных режимах стимуляции малоберцового нерва.

Для регистрации М-ответов мышцы использовалась экспериментальная установка, состоящая из двух каналов: канала электростимулятора и электромиографического. Канал электростимулятора представлен собственно электростимулятором, построенным на основе функционального генератора

ICL8038CCDP 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, построенным на основе измерительного усилителя INA118. Оба канала были связаны с регистрирующим устройством – запоминающим цифровым осциллографом Tektronix (TDS2004C).

Ход опыта был следующим. У наркотизированного животного препаровали в области бедра малоберцовый нерв и на расстоянии 1 см проксимальнее коленного сустава подводили под него раздражающие электроды, а в среднюю часть передней большеберцовой мышцы вводили отводящие биполярные игольчатые стальные электроды с межэлектродным расстоянием 1 мм.

После выполнения подготовительных процедур регистрировали в течение 5 с серию М-ответов мышцы, вызванную раздражением малоберцового нерва сверхпороговыми электрическими импульсами (длительность – 150 мкс каждый и сила тока – 500 мкА) низкой частоты (4 имп/с). На основании полученных записей оценивали изменение амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го, принятого за 100 %, и судили о надежности нервно-мышечной передачи.

Затем в течение 5 с регистрировали серию М-ответов мышцы при оптимальной частоте раздражения малоберцового нерва – 30 имп/с (длительность и сила электрических импульсов оставались прежними – 150 мкс и 500 мкА). На основании этих записей определяли изменение амплитуды М-ответов в процессе ритмической их генерации с частотой 30 в секунду относительно 1-го, амплитуда которого принималась за 100 %. По степени увеличения и уменьшения амплитуды М-ответов в серии относительно амплитуды 1-го М-ответа судили об облегчении и депрессии синаптической передачи.

На следующем этапе на малоберцовый нерв в течение 6 с наносили серию импульсов с плавно нарастающей частотой от 4 до 70 имп/с (длительность импульсов составляла 50 мкс, сила тока – 1000 мкА). При этом мышца постепенно переходила от одиночных сокращений к тетанусу и, сокращаясь, поднимала груз в 20 г. Для нанесения на малоберцовый нерв импульсов нарастающей частоты использовали специальный стимулятор, построенный на основе управляемого функционального генератора ICL8038.

На основании полученных записей оценивали амплитуду 1-го М-ответа в серии, среднюю амплитуду М-ответов каждого животного в диапазоне частот 30–50 имп/с (оптимальные частоты для НМА) и при частоте 70 имп/с (высокая частота). На основании этих амплитуд определяли у каждого животного изменение (в %) средних амплитуд М-ответа при частоте 30–50 имп/с и 70 имп/с к амплитуде 1-го М-ответа в серии. Кроме того, по этим записям определяли амплитуду одиночного М-ответа до и после 6-секундной тетанизации, и по степени изменения амплитуды одиночного М-ответа после тетануса относительно исходной (перед тетанусом) судили о посттетаническом облегчении.

Затем проводилась регистрация М-ответов мышцы и кривой ее тетанического сокращения (с внешней нагрузкой 70 г) в процессе выполнения утомляющей работы

(УР), которую индуцировали путем высокочастотного раздражения электрическим током малоберцового нерва (70 имп/с, длительность импульсов – 0,5 мс и сила тока – 1000 мкА) вплоть до почти полного расслабления мышцы на фоне продолжающейся электрической стимуляции. На основании полученных записей устанавливали процентное снижение амплитуды М-ответов (относительно 1-го М-ответа в серии) при достижении максимальной амплитуды тетануса, а также уменьшении амплитуды тетануса на 50 % и 80 % относительно максимально достижимой.

После выполнения мышцей УР вновь регистрировали серию М-ответов мышцы при раздражении малоберцового нерва с низкой частотой (4 имп/с) и оценивали надежность нервно-мышечной передачи после утомления.

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

Статистическая обработка экспериментальных данных. Оценку статистической достоверности различий между центральными тенденциями сравниваемых групп осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента, предварительно убедившись в том, что распределение значений в исследуемых вариационных рядах близко к нормальному (W-тест Шапиро-Уилка, Statistica, 7.0), и F-статистики на основании проверки нулевой и альтернативной гипотез. Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически достоверные. Исследуемые параметры выражали в виде «среднее \pm стандартная ошибка».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ характера изменения параметров М-ответа мышцы животных ДМ-группы при разных режимах стимуляции малоберцового нерва выявил косвенные признаки ухудшения функционального состояния синаптического аппарата. Так, длительное изолированное введение ДМ сопровождалось ухудшением надежности синаптической передачи. В пользу этого свидетельствует наблюдаемый у большинства животных ДМ-группы (70 % особей) патологически значимый (превышающий 10 %) декремент амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го при раздражении НМА с низкой частотой (4 имп/с) и в целом более высокая в сравнении с контролем ($p < 0,05$) средняя по ДМ-группе величина этого декремента (см. табл. 1).

Уменьшение надежности нервно-мышечной передачи при длительном введении ДМ наблюдалось и в более ранних исследованиях, проведенных в нашей лаборатории [24], и может быть обусловлено как пре-, так и постсинаптическими нарушениями, возникающими под действием фармакологических доз ГК.

Вместе с тем, после выполнения УР частота встречаемости патологически значимого декремента амплитуды М-ответов при низкой частоте стимуляции НМА у животных ДМ-группы существенно понижалась (до 30%) и средний по группе декремент амплитуды М-ответов значимо не отличался от контрольного (см. табл. 1). Амплитуда 1-го М-ответа в серии после УР у животных ДМ-группы

уменьшалась в такой же мере (на 38 % относительно исходного значения), как и у контроля (на 37 %, см. табл. 1).

Уменьшение частоты встречаемости патологически значимого декремента амплитуды М-ответа у животных ДМ-группы после УР было обнаружено и в более ранних наших исследованиях [25]. В основе данного явления могут лежать две причины: с одной стороны, полное выключение части патологически измененных МВ из возбуждения после утомления, с другой – частичное включение в работу предварительно заблокированных синапсов. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что, несмотря на то, что амплитуда 1-го М-ответа в серии у животных ДМ-группы была значимо ниже, чем у контроля ($p < 0,05$), после УР она уменьшалась относительно исходного уровня в такой же степени, как и у контроля (см. табл. 1).

Таблица 1

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) амплитуды 1-го М-ответа в серии и декремента амплитуды 5-го М-ответа относительно 1-го (в %) при частоте стимуляции малоберцового нерва 4 имп/с в мышце контрольных животных и крыс, получавших дексаметазон (ДМ) и альфакальцидол (АЛФ) изолированно и комплексно (ДМ+АЛФ)

Параметр	Группа животных			
	К	ДМ	ДМ+АЛФ	АЛФ
Исходные значения (до утомляющей работы)				
Амплитуда 1-го М-ответа в серии, мВ	2,5±0,21	1,7±0,22 [-33*]	4,1±0,29 [+64*], +145 ^x	4,1±0,44 [+65*]
Декремент амплитуды М-ответа, %	2,4±1,14	-19,5±4,02 [°]	-0,7±2,53	1,5±3,36
% особей в группе с декрементом амплитуды М-ответов более 10%	0	70	0	0
Значения после утомляющей работы				
Амплитуда 1-го М-ответа в серии, мВ	1,6±0,22 (-37±3,9●)	1,0±0,15 (-38±3,9●), [-36*]	2,5±0,31 (-40±8,6●) [+54*], +139 ^x	2,8±0,33 (-31±7,6●), [+77*]
Декремент амплитуды М-ответа, %	1,9±0,99	-8,8±6,09	1,1±7,65	-2,5±4,06
% особей в группе с декрементом амплитуды М-ответов более 10%	0	30	30	0

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 %, $p < 0,05$); ^x – указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения ДМ-группы (в %, $p < 0,05$); [°] – разница декремента амплитуды М-ответа в опытной группе статистически значима ($p < 0,05$) относительно такового контроля.

С целью более детального изучения возможных причин снижения надежности синаптической передачи при длительном введении ДМ, мы сочли необходимым проанализировать степень посттетанического облегчения, которую оценивали по приросту амплитуды М-ответа сразу после 6-ти секундного гладкого тетануса с малой нагрузкой (20 г) относительно исходной амплитуды М-ответа (перед тетанусом).

Анализ изменения амплитуды М-ответов до и после 6-ти секундной тетанизации у животных ДМ-группы показал следующее. Амплитуда исходного М-ответа (до тетануса) у крыс ДМ-группы была значимо ниже ($p < 0,01$), чем у контроля (на 65 %), но степень ее прироста после 6-ти секундного тетануса у животных ДМ-группы существенно превосходила таковую контроля ($p < 0,01$), в результате чего амплитуда М-ответа животных ДМ-группы после тетануса значимо не отличалась от контрольного значения после тетануса (см. табл. 2). Данный факт указывает в пользу выраженного посттетанического облегчения у крыс ДМ-группы, и, поскольку это облегчение имело место на фоне сниженной относительно контроля ($p < 0,05$) амплитуды исходных М-ответов, наиболее вероятной его причиной является частичная исходная заблокированность синапсов [26].

Согласно Гехту Б. М. [26] при исходной частичной заблокированности синапсов уменьшается или вообще исчезает декремент амплитуды М-ответов после тетануса, тогда как до тетанизации он проявляется. Как уже отмечалось ранее, у животных ДМ-группы наблюдалось существенное уменьшение частоты встречаемости патологически значимого декремента амплитуды М-ответов при низкой частоте стимуляции НМА (4 имп/с) после УР в сравнении с исходным значением (с 70 % до 30 %, см. табл. 1). Данный факт на фоне гораздо более выраженного посттетанического облегчения у крыс ДМ-группы еще раз подтверждает наличие у них исходной заблокированности синапсов.

Таблица 2

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) амплитуды М-ответа и степени ее изменения (в % относительно исходного значения) после 6-секундной тетанизации мышцы контрольных животных и крыс, получавших дексаметазон (ДМ) и альфакальцидол (АЛФ) изолированно и комплексно (ДМ+АЛФ)

Группа животных	Амплитуда М-ответа исходная, мВ	Амплитуда М-ответа после 6-секундной тетанизации, мВ	Посттетаническое облегчение (% изменение амплитуды М-ответа после тетануса к исходной)
К	3,1±0,24	2,8±0,28	-10,9±3,08
ДМ	1,1±0,25, [-65*]	2,0±0,51	83,9±24,62°
АЛФ	3,9±0,38	3,8±0,41	-2,6±3,42
ДМ+АЛФ	3,4±0,33, +209 ^x	3,4±0,34, +71 ^x	1,9±5,89 ^x

Примечание: * – различия статистически значимы относительно соответствующего значения контрольной группы ($p < 0,05$); ^x – различия статистически значимы относительно соответствующего значения ДМ-группы ($p < 0,05$); ° – разница в величине посттетанического облегчения опытной группы статистически значима ($p < 0,01$) относительно таковой контроля

Введение АЛФ в комплексе с ДМ предотвратило снижение амплитуды 1-го М-ответа в серии при низкой частоте стимуляции НМА (4 имп/с), появление патологически значимого декремента амплитуды М-ответа до тетанизации (см. табл.1), а также выраженное посттетаническое облегчение (см. табл. 2), типичные для ДМ-группы. Вместе с тем, у 30 % особей ДМ+АЛФ-группы после УР регистрировался патологически значимый декремент амплитуды М-ответа при низкой частоте стимуляции нерва (4 имп/с), тогда как для контрольных особей, мышца которых выполняла такую же работу, он не был характерен (см. табл. 1). Данные факты указывают в пользу отсутствия исходной заблокированности синапсов у крыс ДМ+АЛФ-группы, но при этом снижения у части животных надежности синаптической передачи и возможно более высокой утомляемости синапсов, обусловленных либо постсинаптическими изменениями, либо посттетаническим истощением запасов медиатора в пресинаптических окончаниях в связи с нарушением его ресинтеза.

В связи с тем, что у животных ДМ- и ДМ+АЛФ-групп выявлялись признаки сниженной надежности синаптической передачи, в основе которых могут лежать как пре-, так и постсинаптические нарушения, на следующем этапе для более полной оценки функционального состояния синаптического аппарата мы сочли необходимым исследовать характер изменения амплитуды М-ответов при стимуляции малоберцового нерва с оптимальной частотой – 30 имп/с.

Анализ полученных данных показал, что при изолированном введении ДМ имело место уменьшение амплитуды 1-го М-ответа в серии при раздражении НМА с оптимальной частотой (30 имп/с), и у 50 % особей наблюдалось патологически значимое облегчение синаптической передачи, проявляющееся в приросте амплитуды М-ответа относительно таковой 1-го в более чем 30 %. Средняя по ДМ-группе степень облегчения синаптической передачи превышала 30 % и оказалась значимо выше уровня контроля ($p < 0,05$, см. табл. 3).

В связи с тем, что выраженное (превышающее 30 %) облегчение синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции НМА у животных ДМ-группы имело место на фоне сниженной амплитуды 1-го М-ответа в серии, наиболее вероятной его причиной является исходная заблокированность синапсов, обусловленная возможным дефицитом медиатора или затруднением его кальцийзависимого экзоцитоза. Таким образом, и при раздражении НМА с оптимальной частотой (30 имп/с) у животных ДМ-группы выявлялись признаки заблокированности синапсов.

Наряду с выраженным облегчением синаптической передачи у части животных ДМ-группы (30 % особей) при оптимальной частоте стимуляции НМА отмечалась патологически значимая депрессия синаптической передачи, проявляющаяся в понижении амплитуды М-ответов относительно амплитуды 1-го в серии более чем на 25 % (см. табл. 3). Средняя по ДМ-группе степень депрессии синаптической передачи не достигала 25 %, но значимо превосходила контрольный уровень ($p < 0,05$, см. табл. 3).

В основе наблюдаемой нами у некоторых животных ДМ-группы патологически значимой депрессии синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции

НМА (30 имп/с) могут лежать определенные постсинаптические нарушения: уменьшение плотности холинорецепторов или их чувствительности к ацетилхолину, в том числе в связи с выраженным его накоплением в синаптической щели по мере ритмической активности синапса [26]. Отчасти такое накопление медиатора в синаптической щели при ритмической активности синапса, предопределяющее десенситизацию холинорецепторов, может быть вызвано понижением активности холинэстеразы под действием ГК, о чем свидетельствуют данные других исследователей [5, 12].

Введение АЛФ в комплексе с ДМ полностью предотвратило появление случаев патологически значимого облегчения синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции НМА, но не привело к предотвращению случаев выраженной депрессии синаптической передачи, типичных для ДМ-группы, и не обусловило уменьшения частоты их появления. Так, патологически значимая депрессия синаптической передачи при раздражении НМА с оптимальной частотой встречалась у 30 % особей ДМ+АЛФ-группы, и средняя по группе степень этой депрессии превышала контрольное значение ($p < 0,05$, см. табл. 3).

Таблица 3

Средние значения ($\bar{X} \pm m$) амплитуды М-ответа и степени облегчения и депрессии синаптической передачи (повышения и понижения в % амплитуды М-ответов относительно 1-го в серии) при оптимальной частоте стимуляции малоберцового нерва (30 имп/с) у контрольных животных и крыс, получавших дексаметазон (ДМ) и альфакальцидол (АЛФ) изолированно и комплексно (ДМ+АЛФ)

Параметр М-ответа	Группа животных			
	К	ДМ	ДМ+АЛФ	АЛФ
Амплитуда 1-го М-ответа в серии, мВ	2,4±0,21	1,7±0,21 [-31*]	4,6±0,55, [+91*], +178 ^x	4,7±0,57, [+94*]
Степень облегчения синаптической передачи, %	11,1±2,86	37,8±8,91 [°]	7,7±3,46 ^x	10,5±5,31
% особей в группе с синаптическим облегчением более 30%	0	50	0	0
Степень депрессии синаптической передачи, %	-5,7±2,58	-19,5±5,34 [°]	-18,7±5,11 [°]	-8,5±3,16
% особей в группе с синаптической депрессией более 25%	0	30	30	0

Примечание: * – в квадратных скобках указана статистически значимая разница показателя относительно контрольной группы (в %, $p < 0,05$); ^x – указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения ДМ-группы (в %, $p < 0,05$); [°] – разница степени облегчения или депрессии синаптической передачи в опытной группе статистически значима ($p < 0,05$) относительно таковой контроля

Отсутствие случаев патологически значимого облегчения синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции НМА у животных ДМ+АЛФ-группы еще раз подтверждает отсутствие у них исходной заблокированности синапсов. Вместе с тем, наличие у 30 % особей ДМ+АЛФ-группы патологически значимой депрессии синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции НМА свидетельствует в пользу сохранности у них определенных постсинаптических нарушений, вызванных ДМ, – уменьшения плотности холинорецепторов в синаптической мембране или их чувствительности к ацетилхолину.

В связи с тем, что при оптимальной частоте стимуляции НМА нами были выявлены определенные пре- и постсинаптические нарушения у животных ДМ-группы и сохранность постсинаптических нарушений в ДМ+АЛФ-группе, на следующем этапе исследований мы сочли необходимым оценить лабильность синаптической передачи, раздражая малоберцовый нерв электрическими стимулами с высокой частотой (70 имп/с), и при плавном увеличении частоты стимуляции (от 0,2 до 70 имп/с).

Анализ полученных данных показал следующее. Изолированное введение ДМ обуславливало более существенные, чем у контроля ($p < 0,05$), колебания амплитуды М-ответов (относительно таковой 1-го в серии) при раздражении НМА стимулами нарастающей частоты (от 0,2 до 70 имп/с). Так, спустя 30 дней изолированного введения ДМ наблюдалось значимое относительно контроля понижение амплитуды 1-го М-ответа в серии (на 46 %, $p < 0,05$) и гораздо более выраженные, чем у контроля ($p < 0,05$), колебания амплитуды М-ответов при разных частотах стимуляции малоберцового нерва: существенное ее увеличение (на 75 % относительно амплитуды 1-го М-ответа в серии, $p < 0,05$) при частоте раздражения НМА 30-50 имп/с и выраженное снижение (на 41 % относительно амплитуды 1-го М-ответа в серии, $p < 0,05$) при высокой частоте стимуляции малоберцового нерва (70 имп/с) (см. табл. 4).

Наблюдаемое нами у животных ДМ-группы гораздо более выраженное, чем у контроля, повышение амплитуды М-ответов на фоне сниженной относительно контроля амплитуды 1-го М-ответа в серии в диапазоне оптимальных частот стимуляции НМА (30-50 имп/с) еще раз подтверждает исходную заблокированность синапсов, тогда как выраженное снижение амплитуды М-ответов при высокой частоте стимуляции малоберцового нерва (70 имп/с) указывает в пользу сниженной лабильности синапсов.

Введение АЛФ в комплексе с ДМ несколько модулировало характер изменения амплитуды М-ответов мышцы при раздражении НМА стимулами плавно нарастающей частоты (от 0,2 до 70 имп/с) в сравнении с ДМ-группой.

Во-первых, при комплексном применении ДМ и АЛФ не наблюдалось уменьшения амплитуды 1-го М-ответа в серии, типичного для ДМ-группы, напротив, эта амплитуда превосходила ($p < 0,01$) значения ДМ-группы и контроля (см. табл. 4).

Во-вторых, у животных ДМ+АЛФ-группы отсутствовало типичное для ДМ-группы более существенное, в сравнении с контролем, повышение амплитуды М-ответов относительно таковой 1-го в серии в диапазоне частот стимуляции

малоберцового нерва 30-50 имп/с (см. табл. 4). Данный факт на фоне обсуждаемых ранее отсутствия выраженного посттетанического облегчения и патологически значимого прироста амплитуды М-ответов при оптимальной частоте стимуляции малоберцового нерва (30 имп/с), типичных для ДМ-группы, еще раз подтверждает отсутствие заблокированности синапсов у животных ДМ+АЛФ-группы.

Таблица 4

Изменение амплитуды М-ответов мышцы ($\bar{X} \pm m$) по мере увеличения частоты стимуляции нервно-мышечного аппарата от 0,2 до 70 имп/с у контрольных животных и крыс, получавших дексаметазон (ДМ) и альфакальцидол (АЛФ) изолированно и комплексно (ДМ+АЛФ)

Группа животных	Амплитуда 1-го М-ответа в серии, мВ	Изменение амплитуды М-ответов (в % относительно 1-го) по мере повышения частоты стимуляции малоберцового нерва	
		при частоте стимуляции 30-50 имп/с	при частоте стимуляции 70 имп/с
К	2,2±0,24	16,8±3,65	-3,9±2,19
ДМ	1,2±0,14, [-46*]	75,0±15,94 [•]	-41,4±7,64 [•]
АЛФ	2,9±0,33	25,9±8,85	-3,4±2,76
ДМ+АЛФ	2,7±0,29, +122 ^x	9,1±3,14 ^x	-43,3±6,51 [•]

Примечание: * – в квадратных скобках указана статистически значимая ($p < 0,05$) разница показателя относительно контрольной группы; • – изменение амплитуды М-ответа относительно таковой 1-го в серии статистически значимо ($p < 0,01$); ^x – указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения ДМ-группы (в %, $p < 0,01$); [°] – разница степени изменения амплитуды М-ответа относительно таковой 1-го в серии статистически значима ($p < 0,01$) в сравнении с соответствующим изменением амплитуды М-ответа у контроля

Вместе с тем, подобно ДМ-группе в ДМ+АЛФ-группе сохранялось более выраженное, в сравнении с контролем ($p < 0,05$), снижение амплитуды М-ответов относительно таковой 1-го в серии (на 43 %, $p < 0,05$) в диапазоне высоких частот стимуляции НМА (70 имп/с). Следовательно, у животных, получавших ДМ в комплексе с АЛФ, сохранялась пониженная лабильность синапсов при высокой частоте стимуляции малоберцового нерва, типичная для ДМ-группы. Поскольку одновременно в ДМ+АЛФ-группе регистрировались случаи патологически значимой депрессии синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции малоберцового нерва (30 имп/с), можно предположить, что основными причинами сниженной лабильности синапсов являются постсинаптические нарушения.

На заключительном этапе наших исследований представляло интерес проанализировать характер изменения амплитуды М-ответов мышцы животных разных групп при стимуляции НМА с высокой частотой (70 имп/с) в динамике выполнения мышцей УР с внешней нагрузкой 70 г. На основании изменений амплитуды М-ответов при таком режиме стимуляции НМА можно косвенно судить о его утомляемости и отчасти лабильности.

Анализ полученных данных показал, что длительное изолированное введение ДМ сопровождалось уменьшением амплитуды 1-го М-ответа в серии (на 32 %, $p < 0,05$ относительно контроля) при раздражении НМА с высокой частотой (70 имп/с) и определенными особенностями в сравнении с контролем изменения амплитуды М-ответов в динамике выполнения мышцей УР (табл. 5).

Во-первых, для мышцы животных ДМ-группы было характерно более выраженное в сравнении с контролем ($p < 0,05$) снижение амплитуды М-ответов (относительно амплитуды 1-го М-ответа в серии) при максимальной амплитуде тетануса (на 26 % против снижения в 10 % у контроля), что указывает в пользу меньшей лабильности их синапсов или возможного энергодефицита МВ, обуславливающего нарушение нормальной работы Na^+/K^+ -насоса и развитие стойкой их деполяризации на начальных этапах высокочастотной стимуляции.

Во-вторых, у животных ДМ-группы имело место и более выраженное в сравнении с контролем ($p < 0,05$) падение амплитуды М-ответов мышцы относительно 1-го в серии на заключительных этапах развития утомления (при снижении амплитуды тетануса на 50 % и 80 % относительно максимальной). Данный факт указывает в пользу более высокой утомляемости мышцы крыс ДМ-группы, развития более выраженного энергодефицита в ее волокнах и возможной их контрактуры.

Введение АЛФ в комплексе с ДМ несколько модулировало характер изменения амплитуды М-ответов мышцы в динамике выполнения УР (см. табл. 5).

Таблица 5

Изменение амплитуды М-ответов мышцы ($\bar{X} \pm m$) в момент ее тетанической утомляющей работы у контрольных животных и крыс, получавших дексаметазон (ДМ) и альфакальцидол (АЛФ) изолированно и комплексно (ДМ+АЛФ)

Группа животных	Амплитуда 1-го М-ответа в серии, мВ	Изменение амплитуды М-ответов (в % относительно 1-го) на разных этапах утомляющей работы		
		при максимальной амплитуде тетанического сокращения	при снижении амплитуды тетанического сокращения на 50 % относительно максимальной	при снижении амплитуды тетанического сокращения на 80 % относительно максимальной
К	2,4±0,23	-9,8±4,59	-68,6±4,08	-87,0±2,64
ДМ	1,6±0,24, [-32*]	-26,0±4,07°	-86,1±2,87°	-96,0±2,06°
АЛФ	2,8±0,29	-3,7±2,47	-76,6±4,39	-86,0±1,43
ДМ+АЛФ	2,6±0,29, +54 ^x	-5,9±2,95 ^x	-77,0±3,59	-91,2±1,28

Примечание: * – в квадратных скобках указана статистически значимая ($p < 0,05$) разница показателя относительно контрольной группы; ^x – указана статистически значимая разница показателя относительно соответствующего значения ДМ-группы (в %, $p < 0,05$); ° – разница степени изменения амплитуды М-ответа относительно таковой 1-го в серии статистически значима ($p < 0,01$) в сравнении с соответствующим изменением амплитуды М-ответа у контроля

Во-первых, у животных ДМ+АЛФ-группы не наблюдалось типичного для ДМ-группы значимого относительно контроля снижения амплитуды 1-го М-ответа в серии при стимуляции НМА с высокой частотой (70 имп/с).

Во-вторых, у крыс ДМ+АЛФ-группы степень уменьшения амплитуды М-ответа относительно 1-го в серии при раздражении малоберцового нерва с высокой частотой (70 имп/с) на различных этапах УР значимо не отличалась от таковой контроля (см. табл. 5). В то же время, некоторая тенденция к более выраженному в сравнении с контролем уменьшению амплитуды М-ответов относительно таковой 1-го в серии на заключительных этапах УР у животных ДМ+АЛФ-группы все же сохранялась, но она не достигала статистически значимого характера, типичного для ДМ-группы.

Поскольку основной причиной более выраженного снижения амплитуды М-ответов по мере выполнения УР у животных ДМ-группы в сравнении с контролем, скорее всего, является более выраженный энергодефицит в МВ, обуславливающий деполяризацию МВ и, как следствие, понижение амплитуды М-волны, можно высказать 2 гипотезы. Во-первых, длительно вводимый ДМ вызывал развитие энергодефицита в МВ, в пользу чего косвенно свидетельствует более выраженное в сравнении с контролем падение амплитуды М-ответов по мере утомления. Во-вторых, АЛФ, вводимый в комплексе с ДМ, обуславливал уменьшение степени этого энергодефицита, в результате чего у животных ДМ+АЛФ-группы наблюдалась лишь недостоверная тенденция к более выраженному в сравнении с контролем снижению амплитуды М-ответов по мере развития утомления.

В пользу способности АЛФ улучшать функциональное состояние и выносливость СМ свидетельствуют и другие исследователи [27, 28]. Выявлено, что активный метаболит АЛФ – кальцитриол – увеличивает относительную экспрессию генов VDR, PGC1 α и PPAR γ у пациентов с ожирением [29]. PGC-1 α , в свою очередь, участвует в регуляции активности митохондриальных генов, окислительного метаболизма и адаптации мышц к физическим нагрузкам, а также координирует внутримышечную программу отложения липидных капель и процессы митохондриального ремоделирования [29].

Кроме того, дефицит кальцитриола, в том числе имеющий место при длительной ГК-терапии [16], обуславливает повышение резистентности периферических тканей к инсулину по причине ослабления экспрессии рецепторов PPAR γ [30]. Кальцитриол же усиливает экспрессию этих рецепторов [31] и тем самым способствует благоприятному влиянию физической нагрузки на организм.

В то же время не все авторы признают способность АЛФ повышать устойчивость СМ к утомлению [32], а некоторые [33, 34] наблюдали его положительное действие на мышечную силу и мышечный метаболизм только у индивидов с исходным дефицитом витамина D.

Интересно, что при исследовании степени снижения амплитуды М-ответов мышцы по мере развития утомления в условиях нашего эксперимента не было обнаружено способности АЛФ, применяемого изолированно, существенным образом повышать устойчивость мышцы к утомлению. В пользу этого

свидетельствует тот факт, что степень снижения амплитуды М-ответов по мере снижения амплитуды тетанического сокращения на 50 % и 80 % относительно максимальной в АЛФ-группе значимо не отличалась от контроля (см. табл. 5). Вместе с тем, АЛФ при комплексном введении с ДМ существенно ослабил степень уменьшения амплитуды М-ответов по мере выполнения УР в сравнении с ДМ-группой. Очевидно, способность АЛФ позитивно влиять на устойчивость мышцы к утомлению, действительно проявляется в условиях его исходного дефицита, в том числе характерного для длительной ГК-терапии [16, 35].

Подводя итог изложенному, необходимо заключить, что комплексное введение ДМ и АЛФ предотвратило типичное для части особей ДМ-группы появление патологически значимого облегчения синаптической передачи при оптимальной частоте стимуляции нерва (30 имп/с), что косвенно указывает в пользу отсутствия исходной заблокированности синапсов у животных ДМ+АЛФ-группы. Кроме того, степень уменьшения амплитуды М-ответов относительно 1-го в серии в процессе выполнения мышцей УР у животных ДМ+АЛФ-группы значимо не отличалась от контроля, тогда как в ДМ-группе – превосходила контрольные значения. Данный факт косвенно указывает в пользу способности АЛФ частично ослаблять повышенную утомляемость МВ, вызванную длительным введением ДМ.

Вместе с тем, у части животных ДМ+АЛФ-группы (у 30 % особей) обнаруживалась патологически значимая депрессия синаптической передачи при раздражении НМА с оптимальной частотой (30 имп/с), что указывает в пользу сохранности у них постсинаптических нарушений. Кроме того, в ДМ+АЛФ-группе, подобно ДМ-группе, сохранялось более выраженное, в сравнении с контролем, снижение амплитуды М-ответов относительно таковой 1-го в серии (на 43-42 % против недостоверного уменьшения в 4 % у контроля) при раздражении НМА стимулами нарастающей частоты (0,2-70 имп/с) в диапазоне высоких частот стимуляции (70 имп/с), указывающее в пользу сохранности сниженной лабильности синапсов.

Наконец, введение АЛФ в комплексе с ДМ, хоть и предотвратило типичное для ДМ-группы появление патологически значимого декремента амплитуды М-ответов при низкой частоте стимуляции нерва (4 имп/с) до УР, но у 30 % особей ДМ+АЛФ-группы после УР все же регистрировался патологически значимый декремент амплитуды М-ответов, который свидетельствует в пользу более низкой, в сравнении с контролем, надежности и, возможно, более высокой утомляемости синапсов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АЛФ, вводимый в комплексе с ДМ, предотвратил исходную заблокированность синапсов и ухудшение устойчивости мышцы к утомлению, типичные для ДМ-группы, но не смог полностью предотвратить уменьшения надежности синаптической передачи и развитие постсинаптических нарушений. Вместе с тем, частичные позитивные эффекты АЛФ в компенсации негативного влияния длительно вводимого ДМ на состояние синаптического звена позволяют рассматривать его как одно из возможных средств для ослабления стероидной миопатии.

Список литературы

1. Комердус И. В. Системное действие глюкокортикоидных препаратов: в помощь врачу общей практики (обзор литературы) / И. В. Комердус, Н. А. Будул, А. В. Чеканова // Российский медицинский журнал (РМЖ). – 2017. – №1. – С. 45–48.
2. Sakai H. Dexamethasone exacerbates cisplatin-induced muscle atrophy / H. Sakai, M. Kimura, Y. Tsukimura et. al. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2019. – Vol. 46, №1. – P. 19–28. doi: 10.1111/1440-1681.13024
3. Shin K. Fbxw7 β is an inducing mediator of dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in vivo with the axis of Fbxw7 β -myogenin-atrogenes / K. Shin, Y. Ko, J. Jeong // Mol. Biol. Rep. – 2018. – Vol. 45, №4. – P. 625–631. doi: 10.1007/s11033-018-4185-9
4. Minetto M. A. Muscle fiber conduction slowing and decreased levels of circulating muscle proteins after short-term dexamethasone administration in healthy subjects / M. A. Minetto, A. Botter, F. Lanfranco // J. Clin. Endocrinol. and Metab. – 2010. – Vol. 95, №4. – P. 1663–1671. doi: 10.1210/jc.2009-2161
5. Bu J. Effects of pregnenolone intervention on the cholinergic system and synaptic protein 1 in aged rats / J. Bu, H. Zu // Int. J. Neurosci. – 2014. – Vol. 124, №2. – P. 117–124. doi: 10.3109/00207454.2013.824437
6. Yamate S. Effects of glucocorticoid on brain acetylcholinesterase of developing chick embryos / S. Yamate, H. Nishigori, S. Kishimoto // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2010. – Vol. 36, №1. – P. 11–18. doi: 10.1111/j.1447-0756.2009.01091.x
7. Braun S. Long-term treatment with glucocorticoids increases synthesis and stability of junctional acetylcholine receptors on innervated cultured human muscle / S. Braun, V. Askanas, W. K. Engel // J. Neurochem. – 1993. – Vol. 60. – P. 1929–1935. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb13422.x
8. Агафонов Б. В. К механизму развития нервно-мышечных расстройств при болезни Иценко-Кушинга / Б. В. Агафонов, Т. С. Лагутина, А. Ф. Деянова // Проблемы эндокринологии. – 1982. – №6. – С. 22–26.
9. Неретин В. Я. О генезе неврологических изменений при болезни Иценко-Кушинга и синдроме Кушинга / В. Я. Неретин, С. В. Котов, В. А. Сапфинова // В кн. Вопросы эндокринологии: Республиканский сборник научных работ. – М., 1983. – С. 35–39.
10. Камалиев Р. Р. Воздействие гидрокортизона, АТФ и аденозина на скелетную мышцу крысы / Р. Р. Камалиев, С. Н. Гришин, Ж. Ю. Фалу // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90, № 4. – С. 556–559.
11. Ziganshin A. U. Interaction of hydrocortisone with ATP and adenosine on nervemediated contractions of frog skeletal muscle / A. U. Ziganshin, R. R. Kamaliev, S. N. Grishin et. al. // Eur. J. Pharmacol. – 2009. – Vol. 607. – P. 54–59. doi: 0.1016/j.ejphar.2009.02.028
12. Ebrahimi M. Effect of vitamins B1, B6, and B12 (Neurobion) on Diisopropylfluorophosphate-induced Delayed Neuropathy in Mice / M. Ebrahimi, M. J. Khoushnoud, Zia-M. Behbahani // Iran J. Pharm. Res. – 2018. – Vol. 17, №3. – P. 1116–1124.
13. Grishin S. N. The influence of glucocorticoids and catecholamines on the neuromuscular transmission / S. N. Grishin, A. U. Ziganshin, A. I. Gabdrakhmanov // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. – 2017. – V. 11, №4. – P. 253–260. doi: 10.1134/s1990747817040043
14. Агафонов Б. В. Мышечные поражения при гиперкортицизме / Б. В. Агафонов, А. П. Калинин, В. П. Можеренков // Казанский медицинский журнал. – 1984. – №5. – С. 377–379.
15. Miyakoshi N. Effects of a vitamin D analog, alfacalcidol, on bone and skeletal muscle in glucocorticoid-treated rats / N. Miyakoshi, H. Sasaki, Y. Kasukawa // Biomed. Res. – 2010. – Vol. 31, № 6. – P. 329–336. doi: 10.2220/biomedres.31.329
16. Башкова И. Б. Принципы ведения пациентов с глюкокортикоидным остеопорозом / И. Б. Башкова, И. В. Мадянов // Российский медицинский журнал (РМЖ). – 2018. – №12(II). – С. 99–102.
17. Шиманський І. О. Молекулярно-клітинні механізми захисної дії вітаміну D3 при експериментальному преднізолон-індукованому остеопорозі / І. О. Шиманський, О. О. Лісаковська, М. М. Великий // Біль. Суглоби. Хребет. – 2017. – Т. 7, №3. – С. 93–101.
18. Салухов В. В. Костные и внескостные 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. doi: 10.21518/2079-701X-2018-4-90-99

19. 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. doi: 10.1097/mco.0b013e328331c707
20. Bikle D. D. Extraskeletal actions of vitamin D / D. D. Bikle // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2016. – Vol. 1376, №1. – P. 29–52. doi: 10.1111/nyas.13219
21. Крюкова И. В. Возможности альфакальцидола в профилактике и лечении различных форм остеопороза / И. В. Крюкова // *Российский медицинский журнал (РМЖ).* – 2016. – Т. 20 – С. 1359–1363.
22. Schakman O. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy / O. Schakman, H. Gilson, J. P. Thissen // *J. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 197, №1. – P. 1–10. doi: 10.1677/joe-07-0606
23. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунатян – Москва: Минздрав РФ, ЗАО «Гриф и К», 2012. – 944 с.
24. Соболев В. И. Влияние тироксина на проявление эффектов дексаметазона на параметры М-ответа скелетной мышцы белых крыс / В. И. Соболев, В. В. Труш // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* – 2013. – Т. 99, №9. – С. 1067–1076.
25. Труш В. В. Влияние длительного применения дексаметазона на электрофизиологические параметры скелетной мышцы крыс в покое и при развитии утомления / В. В. Труш, В. И. Соболев // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2018. – Т. 81, №5. – С. 21–26. doi: 10.30906/0869-2092-2018-81-5-21-26
26. Гехт Б. М. Теоретическая и клиническая электромиография / Б. М. Гехт. – Л.: Наука, Ленинградское отделение, 1990. – 228 с.
27. Li N. Efficacy and safety of alfacalcidol in Chinese postmenopausal women aged over 65 with osteoporosis or osteopenia: An open label, non-comparative, post marketing observational study / N. Li, Y. Jiang, S. et. al. // *Medicine (Baltimore).* – 2018. – Vol. 97, №47. – P.e13159. doi: 10.1097/MD.00000000000013159
28. Capatina C. 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. Caragheorghopol, M. Berteanu et. al. // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* – 2016. – Vol. 124, №8. – P. 461–465. doi: 10.1055/s-0042-103932
29. Koves T. R. PPAR γ coactivator 1- α contributes to exercise-induced regulation of intramuscular lipid droplet programming in mice and humans / T. R. Koves, L. M. Sparks, J. P. Kovalik et. al. // *J. Lipid Res.* Feb. – 2013. – Vol. 54, №2. – P. 522–534. doi: 10.1194/jlr.p028910
30. Park S. Vitamin D deficiency impairs glucosestimulated insulin secretion and increases insulin resistance by reducing PPAR- γ expression in nonobese Type 2 diabetic rats / S. Park, D. S. Kim, S. Kang // *J. Nutr. Biochem.* – 2016. – Vol. 27. – P. 257–265. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.09.013
31. Rastegar H. Vitamin D increases PPAR γ expression and promotes beneficial effects of physical activity in metabolic syndrome / H. Rastegar, A. Damirchi, P. Babaei // *Nutrition.* – 2017. – Vol. 36(54–5919). – P. 173–182. doi: 10.1016/j.nut.2016.06.010
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 // *Biomed. Res.* – 2010. – Vol. 31, №5. – P. 273–279. doi: 10.2220/biomedres.31.273
33. Close G. L. Assessment of vitamin D concentration in non-supplemented professional athletes and Healthy adults during the winter months in the UK: implications for skeletal muscle function / G. L. Close, J. Russell, J. N. Cobley // *J. Sports Sci.* – 2013. – Vol. 31. – P. 344–353. doi: 10.1080/02640414.2012.733822
34. 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 // *Osteoporos. Int.* – 2011. – Vol. 22. – P. 859–871. doi: 10.1007/s00198-010-1407-y
35. Kinoshita Y. Vitamin D insufficiency underlies unexpected hypocalcemia following high dose glucocorticoid therapy / Y. Kinoshita, K. Masuoka, S. Miyakoshi // *Bone.* – 2008. – Vol. 42, №1. – P. 226–228. doi: 10.1016/j.bone.2007.09.042

**MODULATION BY ALPHACALCIDOL OF SOME
ELECTROPHYSIOLOGICAL MANIFESTATIONS OF STEROID MYOPATHY
IN MODEL EXPERIMENTS ON ANIMALS**

Trush V. V.¹, Sobolev V. I.²

¹*Donetsk national university, Donetsk, Ukraine,*

²*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Yalta, Republic of Crimea, Russia*

E-mail: ver.trush@yandex.ru

The aim of the research was to study the effectiveness of alfacalcidol (ALF, 0,06 µg/kg/day) in compensating of the electrophysiological manifestations of steroid myopathy, induced by prolonged administration of dexamethasone (DM, 0,25 mg/kg/2 days, treated for 30 days) in model experiments on rats.

Method. The experiments were performed on sexually mature female rats (195–205 g), divided into four groups: control (n=10, C-group), first experimental (n=10, treated dexamethasone, DM-group), second experimental (n=10, treated dexamethasone in combination with alfacalcidol, DM+ALF-group) and third experimental (n=10, treated alfacalcidol, ALF-group). The medicines were administered in doses, adequate to the therapeutic for humans for 30 days: dexamethasone (KRKA, Slovenia) – once every 2 days, i.p. at a dose of 0,25 mg/kg, alfacalcidol (trademark “Alpha D3-Teva”, Catalent Germany Eberbach GmbH, Germany) – daily, orally, at a dose of 0,06 µg/kg. On anesthetized animals (sodium thiopental, 100 mg/kg) a series of M-responses of the tibialis anterior muscle was recorded using the stimulation electromyography method under different modes of stimulation of the fibular nerve with a suprathreshold electric current.

Results. The combined administration of DM and ALF prevented a pathologically significant facilitation of synaptic transmission, which is typical on the background of the reduced amplitude of the 1st M-response in the series (versus to control, $p < 0,05$) for 50 % of individuals of the DM-group at the optimal stimulation frequency of the fibular nerve (30 imp/s). In addition, the degree of post-tetanic facilitation in the DM+ALF-group did not differ significantly from the control, while in the DM-group it significantly exceeded of the control value ($p < 0,01$). These facts indirectly indicate in a favor of the absence in the DM+ALF-group of the initial blocking of synapses, typical for the DM-group.

ALF, administered in combination with DM, partially weakened the increased fatigue of muscle fibers, caused by prolonged DM-administration. This is evidenced by the fact that the degree of decrease in the amplitude of the M-responses relative to the 1st in the series during the performance of high-frequency fatigable work by the muscle (frequency – 70 imp/s, external load – 70 g) in DM+ALF-group was comparable to control, while in the DM-group it exceeded the control values ($p < 0,05$).

At the same time, in 30 % of individuals of the DM+ALF-group pathologically significant depression of synaptic transmission was found during stimulation of the neuromuscular apparatus (NMA) with an optimal frequency (30 imp/s), which indicates in a favor of the preservation of postsynaptic disorders. In addition, in the DM+ALF-group, like the DM-group, a more pronounced decrease compared to the control ($p < 0,05$) of the

amplitude of M-responses concerning to that of the 1st in the series (by 43-42 % versus an insignificant decrease in 4 % in the control) at high stimulation frequency (70 imp/s) of the NMA was persisted. This fact indicates in a favor of the preservation of reduced lability of synapses in DM+ALF-group.

Finally, the administration of ALF in combination with DM, although it prevented before fatigable work the appearance of a pathologically significant decrement in the amplitude of M-responses at a low frequency of nerve stimulation (4 imp/s), which is typical for the DM-group, but in 30 % of individuals of the DM+ALF-group after fatigue a pathologically significant decrement of the amplitude of the M-response was still recorded, which testifies in a favor of a lower, in comparison with control, reliability and, possibly, higher fatigue of synapses.

Conclusion. ALF, administered in combination with DM, prevented the initial blockage of synapses and deterioration of muscle resistance to fatigue, typical for the DM-group, but could not completely prevent a decrease in the reliability of synaptic transmission and the development of postsynaptic disorders. At the same time, the partial positive effects of ALF in compensation of the negative effect of long-term DM-administration on the state of the synaptic link make it possible to consider it as one of the possible means for weakening of steroid myopathy.

Keywords: skeletal muscle; dexamethasone; iatrogenic hypercorticism; steroid myopathy; alfalcidol.

References

1. Komerdu I. V., Budul N. A., Chekanova A. V. Sistemnoye deystviye glyukokortikoidnykh preparatov: v pomoshch' vrachu obshchey praktiki (obzor literatury) (Systemic effects of glucocorticoid: a guide for the General practitioner (literature review), *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal (Russian medical journal, RMJ)*. **1**, 45 (2017).
2. Sakai H., Kimura M., Tsukimura Y., Yabe S., Isa Y., Kai Y., Sato F., Kon R., Ikarashi N., Narita M., Chiba Y., Kamei J. Dexamethasone exacerbates cisplatin-induced muscle atrophy, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **46**, 19 (2019). doi: 10.1111/1440-1681.13024
3. Shin K., Ko Y. G., Jeong J., Kwon H. Fbxw7 β is an inducing mediator of dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in vivo with the axis of Fbxw7 β -myogenin-atrogenes, *Mol. Biol. Rep.* **45(4)**, 625 (2018). doi: 10.1007/s11033-018-4185-9
4. Minetto M. A., Botter A., Lanfranco F., Baldi M., Ghigo E., Arvat E. Muscle fiber conduction slowing and decreased levels of circulating muscle proteins after short-term dexamethasone administration in healthy subjects, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* **95(4)**, 1663 (2020). doi: 10.1210/je.2009-2161
5. Bu J., Zu H. Effects of pregnenolone intervention on the cholinergic system and synaptic protein 1 in aged rats, *Int. J. Neurosci.* **124 (2)**, 117 (2014). doi: 10.3109/00207454.2013.824437
6. Yamate S., Nishigori H., Kishimoto S., Tezuka Y., Fukushima A., Sugiyama T., Nishigori H. Effects of glucocorticoid on brain acetylcholinesterase of developing chick embryos, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **36(1)**, 11 (2010). doi: 10.1111/j.1447-0756.2009.01091.
7. Braun S., Askanas V., Engel W. K., Ibrahim E. N. Long-term treatment with glucocorticoids increases synthesis and stability of junctional acetylcholine receptors on innervated cultured human muscle, *J. Neurochem.* **60(5)**, 1929 (1993). doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb13422.x
8. Agafonov B. V., Lagutina T. S., Deyanova A. F. K mekhanizmu razvitiya nervno-myshechnykh rasstroystv pri bolezni Itsenko-Kushinga (About the mechanism of development of neuromuscular disorders at Itsenko-Cushing's disease), *Problemy endokrinologii (Endocrinology problems)*. **28(6)**, 22 (1982). (In Russian)

9. Neretin V. Ya., Kotov S. V., Sapfirova V. A. O geneze neurologicheskikh izmeneniy pri bolezni Itsenko-Kushinga i sindrome Kushinga (On the genesis of neurological changes at Itsenko-Cushing's disease and Cushing's syndrome), In: *V kn. Voprosy endokrinologii: Respublikanskiy sbornik nauchnykh rabot (Endocrinology issues: Republican digest of treatises)*. **35** (Moscow, 1983).
10. Kamaliev R. R., Grishin S. N., Falou Zh. Yu., Ziganshin A. U. The effect of hydrocortisone, ATP and adenosine on rat skeletal muscle contraction, *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal (Kazan Medical Journal)*. **90(4)**, 556 (2009).
11. Ziganshin A. U., Kamaliev R. R., Grishin S. N., Ziganshin B. A., Burnstock G. Interaction of hydrocortisone with ATP and adenosine on nervemediated contractions of frog skeletal muscle, *Eur. J. Pharmacol.* **607 (1-3)**, 54 (209). doi: 0.1016/j.ejphar.2009.02.028
12. Ebrahimi M., Khoushroud M. J., Zia-Behbahani M. Effect of vitamins B1, B6, and B12 (Neurobion) on Diisopropylfluorophosphate-induced Delayed Neuropathy in Mice, *Iran J. Pharm. Res.* **17(3)**, 1116 (2018).
13. Grishin S. N., Ziganshin A. U., Gabdrakhmanov A. I., Khairullin A. E. The influence of glucocorticoids and catecholamines on the neuromuscular transmission, *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*. **11(4)**, 253 (2017). doi: 10.1134/s1990747817040043
14. Agafonov B. V., Kalinin A. P., Mozherenkov V. P. Myshechnyye porazheniya pri giperkortitsizme (Muscle defeat at hypercortisolism), *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal (Kazan Medical Journal)*. **65 (5)**, 377 (1984).
15. Miyakoshi N., Sasaki H., Kasukawa Yu., Kamo K., Shimada Yo. Effects of a vitamin D analog, alfacalcidol, on bone and skeletal muscle in glucocorticoid-treated rats, *Biomed Res.* **31(6)**, 329 (2010). doi: 10.2220/biomedres.31.329
16. Bashkova I. B., Madyanov I. V. Printsipy vedeniya patsiyentov s glyukokortikoidnym osteoporozom (Principles of management of patients with glucocorticoid osteoporosis), *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal (Russian medical journal, RMJ)*. **12**, 99 (2018).
17. Shimans'kij I. O., Lisakov'ska O. O., Velikij M. M. Molekulyarno-kletochnyye mekhanizmy zashchitnogo deystviya vitamina D3 pri eksperimental'nom prednizolon-indutsirovannom osteoporoze (Molecular cell mechanisms of the protective action of vitamin D3 in experimental prednisolone-induced osteoporosis), *Bil'. Suglobi. Hrebet (Pain. Joints. Spine)*. **7(3)**, 93 (2017).
18. Salukhov V. V., Kovalevskaya E. A., Kurbanova V. V. Kostnyye i vnekostnyye efekty vitamina D, a takzhe vozmozhnosti medikamentoznoy korrektsii yego defitsita (Osteal and extraosteal effects of vitamin D and its opportunities of medication correction of its deficiency), *Meditsinskiy sovet (Medical Council)*. **4**, 90 (2018). doi: 10.21518/2079-701X-2018-4-90-99.
19. Ceglia L. Vitamin D and its role in skeletal muscle, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **12(6)**, 628 (2009). doi: 10.1097/mco.0b013e328331c707
20. Bikle D. D. Extraskeletal actions of vitamin D, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1376(1)**, 29 (2016). doi: 10.1111/nyas.13219
21. Kryukova I. V. Vozmozhnosti al'fakal'tsidola v profilaktike i lechenii razlichnykh form osteoporoza (Alfacalcidol for the prevention and treatment of osteoporosis), *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal (Russian medical journal, RMJ)*. **20**, 1359 (2016).
22. Schakman O., Gilson H., Thissen J. P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy, *J. Endocrinology*. **197(1)**, 1 (2008). doi: 10.1677/joe-07-0606
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, 944 p.
24. Sobolev V. I., Trush V. V. Influence of thyroxine on display of dexamethasone's effects on M-response's parameters of skeletal muscle of white rats, *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal)*, **99(9)**, 1067 (2013).
25. Trush V. V., Sobolev V. I. Influence of long dexamethasone administration on electrophysiological parameters of the rat skeletal muscle at rest and exhaustion development, *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya (Experimental and clinical pharmacology)*. **81(5)**, 21 (2018). doi: 10.30906/0869-2092-2018-81-5-21-26.
26. Geht B. M. *Teoreticheskaya i klinicheskaya elektromiografiya (Theoretical and clinical electromyography)*. 228 p. (Leningrad: Nauka, 1990).

27. Li N., Jiang Y., He S., Zhao Z., Sun J., Li M., Wang O., Xing X., Xia W. Efficacy and safety of alfacalcidol in Chinese postmenopausal women aged over 65 with osteoporosis or osteopenia: An open label, non-comparative, post marketing observational study, *Medicine (Baltimore)*. **97(47)**: e13159 (2018). doi: 10.1097/MD.00000000000013159
28. Capatina C., Caragheorghopol A., Berteanu 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: 10.1055/s-0042-103932
29. Koves T. R., Sparks L. M., Kovalik J. P., Mosedale M., Arumugam R., DeBalsi K. L., Everingham K., Thorne L., Phielix E., Meex R. C., Kien C. L., Hesselink M. K. C., Schrauwen P., Muoio D. M. PPAR γ coactivator 1- α contributes to exercise-induced regulation of intramuscular lipid droplet programming in mice and humans, *J. Lipid Res. Feb.* **54(2)**, 522 (2013). doi: 10.1194/jlr.p028910
30. Park S., Kim D. S., Kang S. Vitamin D deficiency impairs glucosestimulated insulin secretion and increases insulin resistance by reducing PPAR- γ expression in nonobese Type 2 diabetic rats, *J. Nutr. Biochem.* **27**, 257 (2016). doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.09.013
31. Rastegar H., Damirchi A., Babaei P. Vitamin D increases PPAR γ expression and promotes beneficial effects of physical activity in metabolic syndrome, *Nutrition*. **36**, 54 (2017). doi: 10.1016/j.nut.2016.06.010
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: 10.2220/biomedres.31.273
33. Close G. L., Russell J., Cogley J. N., Owens D. J., Wilson G., Gregson W., Fraser W. D., Morton J. P. Assessment of vitamin D concentration in non-supplemented professional athletes and Healthy adults during the winter months in the UK: implications for skeletal muscle function, *J. Sports Sci.* **31(4)**, 344 (2013). doi: 10.1080/02640414.2012.733822
34. 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).
35. Kinoshita Y., Masuoka K., Miyakoshi S., Taniguchi S., Takeuchi Y. Vitamin D insufficiency underlies unexpected hypocalcemia following high dose glucocorticoid therapy, *Bone*, **42(1)**, 226 (2008).