

ОСОБЛИВОСТІ КАЛЬЦІЄВО-ФОСФОРНОГО ОБМІНУ У ВАГІТНИХ ЩУРІВ ІЗ РІЗНИМ ВІТАМІН-D СТАТУСОМ

Поладич І.В. <https://orcid.org/0000-0002-8494-2534>

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

iren.poladich@gmail.com

Актуальність. Вітамін D регулює кальцієво-фосфорний обмін, що критично важливо під час вагітності. Його дефіцит пов'язаний із преєклампсією, затримкою росту плода, гестаційним діабетом та порушенням плацентазії. Через високу поширеність гіповітамінозу D, зокрема в Україні, вивчення його впливу на мінеральний гомеостаз є актуальним.

Ціль: вивчити особливості кальцієво-фосфорного обміну у вагітних щурів із різним вітамін-D статусом.

Матеріали та методи. Дослідження проводилося на 22 вагітних білих щурах лінії Wistar, які були розподілені на три групи: гіповітаміноз D (дієта без холекальциферолу), корекція (дефіцит до вагітності, з 1-го дня введення вітаміну D 400 МО/кг/добу) та контроль (збалансований раціон). Визначали 25(OH)D, Ca²⁺, P, ПТГ та активність ЛФ стандартними біохімічними методами. Статистичний аналіз проводили за допомогою програм MedStat v.5.2 та EZR v.3.4.1, значущість результатів визначали при $p < 0,05$.

Результати. При гіповітамінозі D виявлено достовірне зниження 25(OH)D, Ca²⁺ та P, зростання ПТГ і ЛФ, що свідчить про розвиток вторинного гіперпаратиреозу та активацію остеолізу. Застосування холекальциферолу сприяло підвищенню 25(OH)D, нормалізації кальцієво-фосфорного обміну та зниженню ПТГ, хоча активність ЛФ залишалася підвищеною порівняно з контролем.

Висновок. Дефіцит вітаміну D у період гестації зумовлює глибокі порушення кальцієво-фосфорного гомеостазу, тоді як своєчасна корекція холекальциферолом сприяє його відновленню та профілактиці ускладнень.

Ключові слова: дефіцит вітаміну D, вітамін D3, вагітність, кальцієво-фосфорний обмін, експериментальне дослідження.

Актуальність. Вітамін D – це один із найважливіших регуляторів гомеостазу кальцію та фосфору в організмі, який забезпечує нормальне функціонування опорно-рухового апарату, ендокринної, імунної та репродуктивної систем [1]. Особливу роль він відіграє у період вагітності, коли потреба у мікроелементах та вітамінах зростає як у матері, так і в плода [2]. Одним із ключових аспектів фізіології вагітності є оптимальний обмін кальцію та фосфору, що забезпечує формування кісткової тканини плода, а також збереження мінеральної щільності кісток матері.

Дефіцит вітаміну D залишається глобальною проблемою у медицині, і його вплив на перебіг вагітності активно досліджується протягом останніх десятиліть [3]. За даними ВООЗ, понад мільярд людей у світі мають недостатній рівень вітаміну D, причому жінки репродуктивного віку та вагітні входять до групи підвищеного ризику [4]. Гіповітаміноз D у вагітних асоціюється з низкою ускладнень, серед яких – преєклампсія, затримка внутрішньоутробного розвитку плода, гестаційний діабет, підвищений ризик кесаревого розтину та постнатальні порушення у новонароджених [5].

На фоні недостатнього вітамін-D забезпечення можуть виникати порушення кальцієво-фосфорного обміну, що призводить до вторинного гіперпаратиреозу, зменшення мінералізації кісткової тканини, розвитку остеопенічних синдромів [6]. У вагітних тварин це може відображатись не тільки на здоров'ї самки, а й на формуванні органів і систем плода. Експериментальні моделі на щурах дозволяють детально дослідити ці процеси, зокрема оцінити зміну рівня кальцію, фосфору, активності паратгормону, $25(\text{OH})\text{D}_3$ у сироватці крові залежно від вмісту вітаміну D у дієті або введення його препаратів [7].

Щури є оптимальною моделлю для досліджень у галузі репродуктивної біології та ендокринології завдяки подібності деяких фізіологічних процесів до людських, короткому гестаційному циклу, легкості у спостереженні та контролі зовнішніх факторів. Вивчення змін кальцієво-фосфорного обміну у вагітних щурів із різним вітамін-D статусом дозволяє

змоделювати ймовірні порушення, які можуть виникати у вагітних жінок, та апробувати профілактичні або терапевтичні підходи.

Сучасні уявлення про роль вітаміну D значно вийшли за межі його класичної функції у мінеральному обміні [8]. Виявлено рецептори до кальцитріолу у клітинах багатьох органів і тканин, що не беруть прямої участі у регуляції кальцієвого гомеостазу. Це обґрунтовує доцільність дослідження комплексного впливу вітаміну D на обмін речовин у період вагітності.

Попри значний обсяг наукової інформації, ряд питань залишаються недостатньо вивченими. Зокрема, не до кінця з'ясовано, яким чином різні ступені забезпеченості вітаміном D впливають на концентрацію кальцію та фосфору у крові вагітних тварин, які зміни відбуваються у функціонуванні ендокринної системи в умовах гіпо- чи нормовітамінозу D, як це відображається на розвитку плода.

Ціль: вивчити особливості кальцієво-фосфорного обміну у вагітних щурів залежно від їхнього вітамін-D статусу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідженні було використано статевозрілих самок білих щурів лінії Wistar, які утримувалися у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Умови утримання відповідали нормам лабораторної практики: температура повітря – $+24\text{ }^\circ\text{C}$, відносна вологість – $55 \pm 10\%$, світловий режим – 12 годин світла / 12 годин темряви. Доступ до корму та води був необмеженим.

Після досягнення трижневого віку тварини були переміщені до віварію Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України для адаптації протягом семи днів. Усі маніпуляції проводилися відповідно до чинного національного та міжнародного законодавства у сфері біоетики, включаючи «Європейську конвенцію про захист хребетних тварин, що використовуються у наукових цілях» (1986), Етичний кодекс експериментів на тваринах

(Україна, 2001) та Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006). Протоколи експериментів були схвалені Комісією з біоетики Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

У дослідженні брали участь 22 вагітні самки, які були розподілені на три експериментальні групи: I група (n = 8) – щури з дефіцитом вітаміну D, рівень 25(OH)D у сироватці яких становив <20 нмоль/л; II група (n = 7) – тварини з виявленим дефіцитом, яким проводили корекцію вітаміном D₃; контрольна група (n = 7) – тварини з достатнім рівнем вітаміну D (>30 нмоль/л).

Для моделювання гіповітамінозу тваринам I та II груп призначали дієту з низьким вмістом вітаміну D (рахітогенну дієту) протягом 60 днів [9]. Рівень 25(OH)D визначали в лабораторії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна за допомогою імуоферментного методу. Значення <20 нмоль/л трактували як дефіцит, 20–30 нмоль/л – як недостатність, а понад 30 нмоль/л – як оптимальний рівень.

Для оцінки репродуктивної здатності самок проводили спарювання з самцями аналогічної лінії. До кожної клітки підсаджували одного самця на 2–3 самки. Запліднення фіксували шляхом виявлення сперматозоїдів у мазках з піхви при щоденному ранковому дослідженні (9:00–10:00). День виявлення сперматозоїдів вважався першим днем вагітності (GD 1).

Тваринам II групи проводили корекцію вітамінного дефіциту шляхом щоденного перорального введення розчину холекальциферолу (вітамін D, Sigma, США) у дозі 400 МО/кг маси тіла, починаючи за 30 діб до планованого запліднення.

Для аналізу кальцієво-фосфорного обміну у вагітних щурів забір крові проводили після виведення тварин з експерименту. У сироватці оцінювали рівні кальцію (Ca), лужної фосфатази (ЛФ), фосфору (P), 25(OH)D та паратгормону (ПТГ).

Аналіз 25(OH)D здійснювали відповідно до інструкції імуоферментного набору General 25Hydroxyvitamin D (HVD3) ELISA kit (код UNDL00047, AssayGenie) [10]. Визначення

концентрації HVD3 у зразках виконували за допомогою програми GainData® (ELISA-калькулятор arigo). Визначення кальцію у сироватці вимірювали спектрофотометрично при 540 нм (Lachema Ca test); протеїнозв'язану фракцію осаджували 96 % етанолом, гідролізували NaOH і підраховували ультрафільтрований Ca як різницю між загальним і зв'язаним.

Визначення неорганічного фосфату проводили за Duce: осадження ТСА, реакція з аскорбіновою кислотою та амоній-молібдатом і вимір при 670 нм [11].

Активність лужної фосфатази оцінювали за розщепленням р-нітрофенілфосфату (410 нм, Lachema kit). Кісткову ізоформу отримували як різницю між загальною та теплово інактивованою (56°C, 15 хв) активністю, кишковою – як різницю між загальною та інгібованою 5 мМ L-феніланіном [12].

Рівень ПТГ визначали згідно протоколу до імуоензимної системи Rat

Pth (Parathyroid hormone) ELISA kit (RTFI00259) AssayGenie. Розрахунок концентрації РТН у досліджуваних зразках виконували за допомогою GainData® (arigo's ELISA Calculator).

Статистична обробка отриманих результатів здійснювалась із використанням програмного забезпечення MedStat v.5.2 та EZR v.3.4.1. Перевірку нормальності розподілу здійснювали за критерієм Шапіро-Вілка. Для аналізу міжгрупових відмінностей використовували t-критерій Стюдента для параметричних даних та критерій Фішера – для якісних змінних. Вважали, що відмінності є статистично значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У ході дослідження проаналізовано вміст основних біохімічних показників, які характеризують кальцієво-фосфорний обмін і вітамін-D статус у трьох групах вагітних щурів. Дані наведено в таблиці 1.

Як очікувалось, у тварин I групи рівень 25(OH)D був достовірно нижчим, що підтверджує ефективність моделі дефіциту

Показники кальцієво-фосфорного обміну у вагітних щурів із різним вітамін-D статусом (M±m)

Показник	I група (n=8)	II група (n=7)	Контрольна група (n=7)
25(OH)D, нмоль/л	13,6 ± 1,9*	29,4 ± 2,3	34,2 ± 2,7
Ca, ммоль/л	1,84 ± 0,10*	2,21 ± 0,09	2,28 ± 0,12
P, ммоль/л	2,18 ± 0,14*	1,81 ± 0,12	1,68 ± 0,11
ПТГ, пг/мл	83,5 ± 5,6*	58,9 ± 5,1	46,3 ± 4,2
ЛФ, Од/л	145,2 ± 10,4*	123,6 ± 9,2	113,7 ± 8,6

Примітка. * - статистично значуща різниця порівняно з контрольною групою (p < 0,05)

вітаміну D. Корекція холекальциферолом у II групі забезпечила суттєве підвищення концентрації 25(OH)D, наближене до контрольного рівня.

Із дефіцитом вітаміну D асоційоване зниження рівня кальцію. Після корекції у II групі рівень Ca майже не відрізнявся від контролю, що свідчить про відновлення кальцієвого гомеостазу. Це має важливе значення, оскільки кальцій критично необхідний для нормального перебігу вагітності, зокрема для формування кісткової системи плода, скоротливої здатності матки та метаболізму плаценти.

Гіперфосфатемія у тварин I групи підтверджує порушення фосфорного обміну на тлі гіповітамінозу D. Після корекції рівень фосфору знизився, але залишався вищим за контрольний, що може вказувати на неповне відновлення метаболічного балансу. Надлишковий фосфор може чинити токсичну дію на нирки, порушувати транспорт кальцію та мінералізацію скелету плода.

Вторинний гіперпаратиреоз, спричинений гіпокальціємією у I групі, виявлено за підвищеним рівнем ПТГ. Після корекції його рівень зменшився, проте залишався достовірно вищим за норму. Це може вказувати на потребу у довшій або інтенсивнішій корекції дефіциту. Підвищена концентрація ПТГ здатна негативно впливати на плацентарний транспорт кальцію, підвищуючи ризик затримки внутрішньоутробного розвитку

плода.

Підвищення активності ЛФ у I групі свідчить про активацію процесів ремоделювання кісткової тканини. Висока активність може бути компенсаторною відповіддю на дефіцит кальцію. Після корекції ЛФ знизилась, проте повної нормалізації не досягнуто. Персистуюча активність ферменту може свідчити про продовження адаптивних змін у кістковій системі, що у період вагітності є потенційним ризиком розвитку остеомаліції вагітних або недостатнього кальцієвого забезпечення плода.

Отримані дані підтверджують, що дефіцит вітаміну D у вагітних щурів супроводжується вираженими порушеннями кальцієво-фосфорного обміну. У тварин з гіповітамінозом спостерігалось достовірне зниження рівнів 25(OH)D та кальцію, підвищення концентрацій фосфору, паратиреоїдного гормону (ПТГ) і лужної фосфатази (ЛФ), що свідчить про розвиток вторинного гіперпаратиреозу та активацію процесів резорбції кісткової тканини. Застосування холекальциферолу у групі корекції призвело до нормалізації 25(OH)D та кальцію, зниження ПТГ і ЛФ, однак рівень фосфору залишався підвищеним порівняно з контролем, що вказує на неповне відновлення метаболічної рівноваги.

Виявлені зміни мають важливе біологічне значення у контексті гестації. Гіпокальціємія та гіперфосфатемія на тлі дефіциту вітаміну D можуть негативно впливати на розвиток

кісткової системи плода, скоротливу здатність матки та функціонування плаценти, а також сприяти ускладненням вагітності, зокрема затримці внутрішньоутробного росту [13]. Персистуюче підвищення ПТГ і ЛФ навіть після корекції може свідчити про збереження компенсаторних механізмів, спрямованих на підтримання кальцієвого гомеостазу, що потребує подальшого вивчення оптимальної тривалості та дозування вітамін-D терапії у гестаційному періоді.

ВИСНОВКИ

1. У вагітних щурів із дефіцитом вітаміну D (25(OH)D <20 нмоль/л) спостерігалось зниження рівня кальцію на 19,3 % ($1,84 \pm 0,10$ ммоль/л проти $2,28 \pm 0,12$ ммоль/л у контролі), підвищення фосфору на 29,8 % ($2,18 \pm 0,14$ ммоль/л проти $1,68 \pm 0,11$ ммоль/л), зростання рівня паратгормону на 80,3 % ($83,5 \pm 5,6$ пг/мл проти $46,3 \pm 4,2$ пг/мл) та активності лужної фосфатази на 27,7 % ($145,2 \pm 10,4$ Од/л проти $113,7 \pm 8,6$ Од/л), що свідчить про порушення кальцієво-фосфорного обміну та компенсаторну активацію ремоделювання кісткової тканини.
2. Введення холекальциферолу (400 МО/кг/добу) протягом 30 днів до запліднення та в період гестації дозволило підвищити рівень 25(OH)D₃ з $13,6 \pm 1,9$ нмоль/л до $29,4 \pm 2,3$ нмоль/л ($p < 0,001$), зменшити рівень ПТГ на 29,4 % (до $58,9 \pm 5,1$ пг/мл; $p < 0,05$) та нормалізувати рівень кальцію до $2,21 \pm 0,09$ ммоль/л, що не відрізнявся статистично від контрольного.
3. Незважаючи на позитивну динаміку, рівень фосфору в II групі ($1,81 \pm 0,12$ ммоль/л) залишався вищим за контрольний ($1,68 \pm 0,11$ ммоль/л), а активність лужної фосфатази — на 8,7 % вища, що свідчить про неповне відновлення фосфорно-кальцієвого гомеостазу.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати можуть бути корисними

для розробки стратегій корекції вітамін-D дефіциту у вагітних жінок із ризиком порушення мінерального обміну.

Конфлікт інтересів. Автори даного рукопису стверджують, що конфлікт інтересів під час виконання дослідження та написання рукопису відсутній.

Джерела фінансування. Виконання даного дослідження та написання рукопису було виконано без зовнішнього фінансування.

REFERENCES

1. Palacios C, Kostiuik LL, Cuthbert A, Weeks J. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2024; 7(7):CD008873. DOI: 10.1002/14651858.CD008873.pub5.
2. Poladich IV, Govsieiev DO. (2024). Peculiarity of vitamin D status in pregnant women. *Ukrainian Journal Health of Woman.* 4(173): 46-51; DOI: 10.15574/HW.2024. 4(173).4651.
3. Voulgaris N, Papanastasiou L, Piaditis G, Angelousi A, Kaltsas G, Mastorakos G, Kassi E. Vitamin D and aspects of female fertility. *Hormones (Athens).* 2017; 16(1):5-21. DOI: 10.14310/horm.2002.1715.
4. Keane KN, Cruzat VF, Calton EK, Hart PH, Soares MJ, Newsholme P, et al. Molecular actions of vitamin D in reproductive cell biology. *Reproduction.* 2017;153(1). DOI: 10.1530/REP-16-0386.
5. Hajhashemi M, Khorsandi A, Haghollahi F. Comparison of sun exposure versus vitamin D supplementation for pregnant women with vitamin D deficiency. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019; 32:1347–52. DOI: 10.1080/14767058.2017.1406470
6. Wu J, Shao B, Xin X, Luo W, Mo M, Jiang W, et al. Association of vitamin D pathway gene polymorphisms with vitamin D level during pregnancy was modified by season and vitamin D supplement. *Clin Nutr.* 2021;40(5):3650-60. DOI: 10.1016/j.clnu.2020.12.029.
7. Fleet JC. Vitamin D-Mediated Regulation of Intestinal Calcium Absorption. *Nutrients.* 2022; 14(16):3351. DOI: 10.3390/nu14163351
8. Kaplan S, Türk A, Aydın H, Erten M, Kırıcı P.

- Vitamin D improves oxidative stress and histopathological damage in rat ovaries caused by hyperthyroidism. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021; 47(10):3551-3560. DOI: 10.1111/jog.14948.
9. Riasnyi VM, Apukhovs'ka LI, Velykyi MM, Shymans'kyi IO, Labudzyns'kyi DO, Komisarenko SV. Immunomodulatory effects of vitamin D3 and bisphosphonates in nutritional osteoporosis in rats. *Ukr Biokhim Zh.* 2012; 84(2):73-80.
 10. Mazanova AO, Shymanskyi IO, Velyky M. Development and validation of immunoenzyme test-system for determination of 25-hydroxyvitamin D in blood serum. *Biotechnol ACTA.* 2016; 9(2):28-36.
 11. Dyce BJ, Bessman SP. A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood. *Arch Environ Health.* 1973; 27(2):112-5.
 12. Berger L, Rudolph GG, Bowers GN, McComb RB, Wenzel J, Heemstra JG. Alkaline and Acid Phosphatase. In *Standard Methods of Clinical Chemistry*; Meites, S.; 1965, 5, 211–221.
 13. Kiely ME, Wagner CL, Roth DE. Vitamin D in pregnancy: Where we are and where we should go. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020; 201:105669. DOI:10.1016/j.jsbmb.2020.105669.

FEATURES OF CALCIUM-PHOSPHORUS METABOLISM IN PREGNANT RATS WITH DIFFERENT VITAMIN D STATUS

Poladych I.V.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Background. Vitamin D regulates calcium–phosphorus metabolism, which is critically important during pregnancy. Its deficiency is associated with preeclampsia, fetal growth restriction, gestational diabetes, and placentation disorders. Given the high prevalence of hypovitaminosis D, particularly in Ukraine, investigation of its impact on mineral homeostasis remains highly relevant.

Aim: to investigate the characteristics of calcium-phosphorus metabolism in pregnant rats with different vitamin D statuses.

Materials and methods. The study was conducted on 22 pregnant Wistar albino rats, divided into three groups: hypovitaminosis D (diet devoid of cholecalciferol), correction group (vitamin D deficiency before pregnancy, followed by oral administration of vitamin D at 400 IU/kg/day from gestation day 1), and control group (balanced diet with adequate vitamin D content). Serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], ionized calcium (Ca^{2+}), phosphorus (P), parathyroid hormone (PTH), and alkaline phosphatase (ALP) activity were measured using standard biochemical methods. Statistical analysis was performed using MedStat v.5.2 and EZR v.3.4.1 software, with $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results. In the hypovitaminosis D group, a significant decrease in 25(OH)D₃, Ca^{2+} , and P was observed, accompanied by an increase in PTH and ALP activity, indicating secondary hyperparathyroidism and enhanced osteolysis. Cholecalciferol supplementation increased 25(OH)D levels, normalized calcium–phosphorus metabolism, and reduced PTH, although ALP activity remained elevated compared with controls.

Conclusion. Vitamin D deficiency during gestation leads to profound disturbances in calcium–phosphorus homeostasis, whereas timely cholecalciferol supplementation promotes its restoration and may prevent pregnancy complications.

Key words: vitamin D deficiency, vitamin D, pregnancy, calcium-phosphorus metabolism, experimental study.