

THE EFFECTS OF VITAMIN D₃ DEFICIENCY ON CALCIUM–PHOSPHATE HOMEOSTASIS AND THE RANKL/OPG REGULATORY SYSTEM: EXPERIMENTAL STUDY

Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine)

iren.poladich@gmail.com

Pregnancy is accompanied by profound physiological and metabolic adaptations, among which calcium-phosphate metabolism plays a key regulatory role. Vitamin D₃ is essential for mineral homeostasis, immune regulation, and placental function. Its deficiency during gestation may disturb bone remodeling and increase the risk of pregnancy complications.

Aim is to evaluate the effect of vitamin D₃ deficiency on calcium–phosphate metabolism and the RANKL/OPG system in pregnant rats.

Thirty-five female Wistar rats (8–10 weeks, 174±12 g) were divided into three groups: I – vitamin D₃-deficient diet for 60 days before mating (n=14); II – the same diet with oral cholecalciferol (1000 IU/kg/day, n=12); and control (n=10) – standard diet. Serum calcium, phosphate, alkaline phosphatase (ALP), parathyroid hormone (PTH), RANKL, and OPG were measured by spectrophotometric and ELISA methods. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Vitamin D₃ deficiency caused a marked decrease in calcium (1.86±0.02 mmol/L) and phosphate (1.79±0.03 mmol/L) with compensatory hyperparathyroidism (PTH = 325.6±12.8 pg/mL; p<0.05) and elevated ALP activity, indicating increased bone resorption. The RANKL/OPG ratio rose to 0.09±0.007, reflecting activation of osteoclastogenesis. Cholecalciferol supplementation normalized biochemical parameters, reduced PTH by 18%, increased calcium by 3–4%, and lowered ALP by 25–30%.

Vitamin D₃ deficiency disrupts calcium-phosphate homeostasis and enhances RANKL-mediated bone resorption. Correction with cholecalciferol restores mineral balance and osteoimmune regulation. These findings underscore the pathogenetic significance of vitamin D₃ in maintaining skeletal metabolism and preventing gestational complications.

Key words: pregnancy, rats, vitamin D₃, calcium-phosphate metabolism, parathyroid hormone, alkaline phosphatase, RANKL/OPG.

Connection of the publication with planned research work.

The study is performed like a part of a science program of department of obstetrics and gynecology №1 Bogomolets National Medical University “Preservation and restoration of women’s reproductive health in conditions of rapid medical and social changes”, state registration number 0123U100920.

Introduction.

Pregnancy is characterized by complex physiological and metabolic adaptations in the maternal organism aimed at ensuring optimal intrauterine fetal development, functional adjustment of maternal organs to gestational load, and establishment of effective placental circulation. The cardiovascular, respiratory, renal, and endocrine systems experience a substantial increase in functional load, which necessitates corresponding metabolic adjustments to meet the elevated requirements of both the mother and the fetus.

Among the critical components of these adaptations is mineral metabolism, particularly the regulation of calcium, phosphorus, magnesium, and vitamin D₃ levels [1, 2]. These macro- and microelements play essential roles in fetal skeletal formation, regulation of uterine contractility, maintenance of vascular tone, and preservation of normal immune responsiveness, as well as in physiological remodeling of placental vessels. Disruptions in their balance may result in various adverse outcomes, ranging from functional disorders to severe gestational complications that affect the course of pregnancy, labor, and neonatal condition.

Particular attention has been drawn to vitamin D₃ – the biologically active form of vitamin D – which, beyond its classical role in facilitating intestinal absorption of calcium and phosphorus, exerts numerous pleiotropic effects. These include modulation of immune responses, regulation of gene expression, and control of cellular proliferation, apoptosis, and angiogenesis [3, 4]. Furthermore, vitamin D₃ is involved in the regulation of parathyroid hormone (PTH) secretion, which is crucial for maintaining calcium–phosphate homeostasis. It is well established that vitamin D₃ enhances calcium and phosphate absorption and contributes to the development and function of bone tissue.

According to international studies, hypovitaminosis D₃ represents a global health concern, with more than one billion individuals worldwide having suboptimal serum 25(OH)D levels [5–7]. In pregnant women, this condition is particularly critical due to increased micronutrient demands, reduced sunlight exposure, dietary changes, and hormonal alterations.

Disturbances in the vitamin D₃-calcium homeostatic axis lead to destabilization of bone remodeling processes, including activation of osteoclasts, decreased osteoblastic activity, and reduced bone mineralization. A key regulatory role in these processes is played by the receptor activator of nuclear factor κB ligand/osteoprotegerin (RANKL/OPG) signaling system. RANKL promotes osteoclast differentiation and accelerates bone resorption, whereas OPG acts as a soluble decoy receptor that binds RANKL and prevents its interaction with osteoclast receptors, thereby inhibiting bone resorption [8]. The

RANKL/OPG ratio is considered a sensitive biomarker of bone metabolic status: an elevated ratio indicates predominant resorptive activity, while a reduced ratio reflects enhanced bone formation.

These mechanisms acquire particular relevance during pregnancy, when maternal requirements for calcium and vitamin D₃ markedly increase due to fetal skeletal development and functional adaptations in the maternal organism. Vitamin D₃ deficiency during this period may result in osteopenia or osteomalacia in the mother, delayed ossification in the fetus, and an increased risk of gestational complications such as preeclampsia, intra-uterine growth restriction, and gestational diabetes mellitus [9]. Despite extensive clinical evidence underscoring the importance of adequate vitamin D₃ status during pregnancy, the mechanisms underlying its effects – particularly the interactions between the vitamin D₃ system, the RANKL/OPG axis, calcium-phosphate metabolism, and PTH regulation – remain insufficiently elucidated.

The aim of the study.

To evaluate the effect of vitamin D₃ deficiency on the RANKL/OPG ratio and its relationship with indicators of calcium-phosphate homeostasis in pregnant rats.

Object and research methods.

The experimental study included 35 female Wistar rats aged 8-10 weeks with a mean body weight of 174±12 g. To assess the effect of vitamin D₃ deficiency, the animals were divided into three experimental groups. Group I (n=14): animals were maintained for 60 days prior to mating on a special diet completely devoid of vitamin D₃ to induce its deficiency. Group II (n=12): on the background of the same vitamin D₃-deficient diet, the rats additionally received oral cholecalciferol supplementation (1000 IU/kg body weight per day, dissolved in sunflower oil; Sigma, USA) via gastric gavage, starting 14 days before mating. Control group (n=10): animals were fed a complete standard diet without vitamin D₃ restriction.

All animals were kept under standard laboratory conditions in compliance with animal-care requirements: temperature 22±2°C, relative humidity 55-60%, a 12-h light/12-h dark cycle, and free access to food and water.

The study was conducted in accordance with international ethical standards for the care and use of laboratory animals, particularly Directive 2010/63/EU. The experimental protocol was approved in advance by the Bioethics Committee of Bogomolets National Medical University (Protocol No. 193, dated 24 March 2025) and complied with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and national bioethical guidelines (Kyiv, 2006).

To confirm the formation of vitamin D₃ deficiency in the first group, blood samples were collected at the end of the 60-day period for determination of serum 25(OH)D₃ concentration by enzyme-linked immunosorbent assay (General 25-Hydroxyvitamin D₃ (HVD3) ELISA kit, code UNDL00047, AssayGenie) [10]. Quantitative processing of results

was performed using GainData® software (arigo's ELISA Calculator).

After laboratory confirmation of hypovitaminosis D₃, the females were mated with males in a 2:1 ratio. Successful mating was confirmed by microscopic examination of vaginal smears the next morning to detect spermatozoa; the day of sperm detection was designated as gestational day 1.

For analysis of calcium-phosphate metabolism in pregnant rats, blood samples were collected after the animals were euthanized at the end of the experiment. Serum concentrations of calcium (Ca), alkaline phosphatase (ALP), phosphorus (P), and parathyroid hormone (PTH) were measured.

Serum calcium was determined spectrophotometrically at 540 nm (Lachema Ca-test). The protein-bound fraction was precipitated with 96% ethanol, hydrolyzed with NaOH, and the ultrafiltrable calcium fraction was calculated as the difference between total and bound calcium. Inorganic phosphate was measured using the Dyce method: precipitation with TCA followed by reaction with ascorbic acid and ammonium molybdate and absorbance measurement at 670 nm. ALP activity was evaluated by hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate (410 nm, Lachema kit). The bone isoform was calculated as the difference between total and heat-inactivated activity (56°C, 15 min), and the intestinal isoform as the difference between total and activity inhibited by 5 mM L-phenylalanine [11].

PTH concentrations were determined according to the manufacturer's protocol using the Rat PTH (Parathyroid Hormone) ELISA kit (RTFI00259, AssayGenie). Quantitative results were calculated with GainData® (arigo's ELISA Calculator).

Statistical analysis was performed using StatPlus software (version 7.0, AnalystSoft Inc., USA). The normality of data distribution was tested using the Shapiro-Wilk test. Differences between groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA). Results are presented as mean ± standard deviation (M±SD). Statistical significance was accepted at p<0.05.

Research results and their discussion.

In the present experimental study, alterations in key biochemical parameters characterizing calcium-phosphate homeostasis, the activity of bone metabolism markers, and the functional state of the RANKL/RANK/OPG signaling system were analyzed in pregnant rats with different vitamin D₃ statuses. The obtained results are summarized in **tables 1 and 2**.

In rats with cholecalciferol deficiency (Group I) that had been maintained on a vitamin D₃-free diet for 60 days, pronounced disturbances in the regulation of mineral metabolism were observed. Serum PTH concentration reached 325.6±12.8 pg/mL, which was significantly

Table 1 – Characteristics of calcium-phosphate metabolism in pregnant rats with different vitamin D₃ statuses (M±m)

Indicator	Group I n=14	Group II n=12	Control group III n=10	p (ANOVA)
PTH levels pg/ml	325.6±12.8*	265.8±8.6 [#]	309.6±9.6	0.004
Total calcium, mmol/l	1.86±0.02*	1.92±0.02 [#]	2.30±0.04	<0.001
Inorganic phosphate, mmol/l	1.79±0.03*	2.02±0.07 [#]	2.15±0.03	0.003
Total alkaline phosphatase, μmol/min·l	324.8±2.38*	244.2±3.82 [#]	208.5±1.6	<0.001
Bone isoenzyme of alkaline phosphatase, μmol/min·l	303.2±4.05*	236.2±3.96 [#]	197.3±3.04	<0.001

Table 2 – Serum levels of RANKL, OPG, and the RANKL/OPG ratio in rats with different vitamin D₃ statuses (M±m)

Indicator	Group I n=14	Group II n=12	Control group III n=10	p (ANOVA)
RANKL/OPG	0.09±0.007	0.08±0.01	0.07±0.007	p<0.05
OPG, pg/ml	1538.2±57.9	1634.1±150.9	1649.0±138.8	p>0.05
RANKL, pg/ml	149.2±10.0	143.4±8.7	115.3±12.4	p<0.05

higher than that in the control group (309.6±9.6 pg/mL; p<0.05). This elevation is interpreted as compensatory hyperparathyroidism developing in response to hypocalcemia. The underlying mechanism involves stimulation of PTH secretion to maintain serum calcium levels through activation of osteoclastic resorption and enhanced mobilization of minerals from bone tissue.

A concomitant marked reduction in total calcium concentration was noted – 1.86±0.02 mmol/L versus 2.30±0.04 mmol/L in controls (p<0.001), corresponding to only about 81% of the physiological level. This finding indicates impaired intestinal calcium absorption resulting from decreased synthesis of the active metabolite 1,25(OH)₂D₃. It is well known that vitamin D₃ deficiency reduces hepatic production of 25(OH)D, thereby limiting renal formation of calcitriol and decreasing the expression of calcium-binding proteins in the intestinal epithelium responsible for calcium transport across enterocytes.

Disruption of calcium balance was accompanied by a decrease in inorganic phosphate to 1.79±0.03 mmol/L compared with 2.15±0.03 mmol/L in the control group (p<0.01), indicating enhanced phosphaturia – increased urinary phosphate excretion under the influence of elevated PTH, which inhibits phosphate reabsorption in proximal renal tubules. Collectively, these changes reflect a disturbance of calcium-phosphate homeostasis, one of the key biochemical hallmarks of vitamin D₃ deficiency.

Alterations in calcium and phosphate metabolism were associated with increased enzymatic activity, particularly total and bone-specific alkaline phosphatase (ALP), which are recognized biochemical markers of bone remodeling. Total ALP activity in Group I reached 324.8±2.38 mmol/L, and its bone isoform 303.2±4.05 mmol/L, significantly exceeding control values (208.5±1.6 and 197.3±3.04 mmol/L, respectively; p<0.001). The increased ALP activity reflects activation of osteoblasts attempting to compensate for mineral loss through intensified synthesis of matrix proteins. However, under vitamin D deficiency, this process remains ineffective because the osteoid fails to mineralize properly. Thus, elevated ALP activity serves as a marker of impaired osteogenesis against a background of enhanced bone resorption.

From a morphofunctional standpoint, these findings indicate a shift in bone metabolism toward resorption, consistent with previously published data [12–14]. Recent studies have demonstrated that prolonged vitamin D₃ deficiency induces secondary hyperparathyroidism, increased ALP activity, and impaired bone mineralization [15].

In Group II, following oral cholecalciferol supplementation, a pronounced improvement in the biochemical profile was observed. PTH levels decreased to 265.8±8.6 pg/mL (p<0.05 vs. Group I), indicating suppression of parathyroid hypersecretion in response to normaliza-

tion of calcium status. Concurrently, calcium (1.92±0.02 mmol/L) and phosphate (2.02±0.07 mmol/L) concentrations gradually approached control values.

ALP activity was markedly reduced – to 244.2±3.82 mmol/L (total) and 236.2±3.96 mmol/L (bone-specific) – indicating decreased osteoresorptive activity and stabilization of bone remodeling. The decline in ALP activity following cholecalciferol administration reflects normalization of osteoid maturation and mineralization processes, serving as a biochemical indicator of the effectiveness of vitamin D₃ repletion.

One-way analysis of variance (ANOVA) confirmed statistically significant intergroup differences for all parameters, with more than 60% of the variance in ALP activity explained by vitamin D₃ status.

In parallel with disturbances in calcium-phosphate metabolism, activation of the RANKL/RANK/OPG signaling system – a key regulator of osteoimmune interactions – was detected in Group I (table 2).

In the vitamin D₃-deficient group, serum RANKL levels were elevated (149.2±10.0 pg/mL) compared with the control group (115.3±12.4 pg/mL; p<0.05), while OPG concentrations remained stable (1538.2±57.9 pg/mL versus 1649.0±138.8 pg/mL; p>0.05). This resulted in an increased RANKL/OPG ratio (0.09±0.007), indicating activation of osteoclastogenesis and enhanced bone resorption.

Following cholecalciferol administration, the RANKL concentration decreased to 143.4±8.7 pg/mL, and the RANKL/OPG ratio declined to 0.08±0.01, suggesting partial normalization of osteoimmune regulation. ANOVA confirmed statistically significant intergroup differences for both RANKL (F=5.12; p=0.011; η²=0.24) and RANKL/OPG (F=4.87; p=0.015; η²=0.23).

Mechanistically, these findings can be explained by the regulatory role of vitamin D₃ in the expression of RANKL and OPG genes through its binding to nuclear vitamin D₃ receptors (VDR) in osteoblastic lineage cells. Under conditions of vitamin D deficiency, OPG synthesis is suppressed and RANKL expression is upregulated, leading to an imbalance between bone formation and resorption. Restoration of vitamin D₃ status by cholecalciferol supplementation re-establishes this balance, as demonstrated by our results.

The obtained data have important physiological and clinical implications. Vitamin D₃ deficiency leads to a complex dysregulation of two major regulatory axes: the vitamin D-PTH-calcium-phosphorus axis, and the vitamin D₃-RANKL/OPG-osteoimmune axis.

As a result, compensatory hyperactivity of the parathyroid glands develops, bone mineralization becomes impaired, and osteoclastic resorptive activity increases, which may ultimately contribute to osteopenia, osteomalacia, and vascular calcification.

After cholecalciferol supplementation, systemic normalization of metabolic processes was observed, including a decrease in hyperparathyroid activity, stabilization of calcium-phosphate balance, reduction in osteoclastic activity, and restoration of osteoimmune homeostasis.

These results are consistent with contemporary literature data demonstrating that vitamin D₃ functions not only as a regulator of bone metabolism but also as a pleiotropic hormone involved in endocrine, immune,

and vascular regulation [16-19]. Its active form influences the expression of numerous genes, modulates inflammatory pathways, and contributes to the maintenance of vascular and placental homeostasis during pregnancy.

Conclusions.

Vitamin D₃ deficiency in pregnant rats leads to disruption of calcium–phosphate homeostasis, development of compensatory hyperparathyroidism, and activation of bone resorption processes.

Increased alkaline phosphatase activity and a higher RANKL/OPG ratio indicate stimulation of osteoclastogenesis and a shift in bone metabolism toward resorption.

Cholecalciferol supplementation promotes normalization of PTH levels, stabilization of calcium–phosphate balance, and reduction of osteoresorptive activity.

Vitamin D₃ serves as a key regulator of mineral metabolism and osteoimmune balance; its deficiency significantly alters RANKL/OPG system activity, while supplementation results in an 18% decrease in PTH, a 3-4%

increase in calcium, and a 25-30% reduction in alkaline phosphatase activity, confirming effective restoration of mineral homeostasis.

The obtained findings have essential pathogenetic and practical significance for understanding the role of vitamin D₃ in the prevention of bone metabolism disorders and pregnancy complications associated with its deficiency.

Prospects for further research.

Future studies should aim to elucidate the molecular mechanisms underlying the role of vitamin D₃ in the regulation of calcium–phosphate metabolism and the RANKL/OPG system during pregnancy. Particularly promising directions include investigation of the interactions between 1,25(OH)₂D₃, FGF23, PTH, and markers of endothelial dysfunction. The results may form the basis for developing effective strategies for prevention and correction of vitamin D₃ deficiency in pregnancy.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-4-179-178-186

УДК 612.015.6:615.356–092.9(043.3)

Поладич І. В., Авраменко С. О.

ВПЛИВ ДЕФІЦИТУ ВІТАМІНУ D₃ НА КАЛЬЦІЄВО-ФОСФАТНИЙ ОБМІН ТА СПІВВІДНОШЕННЯ RANKL/OPG В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м. Київ, Україна)

iren.poladich@gmail.com

Період вагітності супроводжується глибокими фізіологічними та метаболічними перебудовами, серед яких кальцієво-фосфатний обмін відіграє ключову регуляторну роль. Вітамін D₃ є необхідним для підтримання мінерального гомеостазу, імунної регуляції та нормального функціонування плаценти. Його дефіцит під час гестації може спричиняти порушення кісткового ремоделювання та підвищувати ризик розвитку ускладнень вагітності.

Мета – оцінити вплив дефіциту вітаміну D₃ на кальцієво-фосфатний обмін і систему RANKL/OPG у вагітних щурів.

У дослідження включено 35 самок щурів лінії Вістар (8-10 тижнів, 174±12 г), розподілених на три групи: I – щури на дефіцитному раціоні без вітаміну D₃ протягом 60 днів до спарювання (n=14); II – аналогічна дієта з пероральним введенням холекальциферолу (1000 МО/кг/добу; n=12); контроль – стандартне харчування (n=10). У сироватці крові визначали кальцій, фосфор, лужну фосфатазу (ЛФ), паратгормон (ПТГ), RANKL та OPG методами спектрофотометрії та ІФА. Статистичну обробку виконували за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA).

Дефіцит вітаміну D₃ супроводжувався зниженням кальцію (1,86±0,02 ммоль/л) і фосфору (1,79±0,03 ммоль/л), компенсаторним гіперпаратиреозом (ПТГ = 325,6±12,8 пг/мл; p<0,05) та підвищенням активності ЛФ, що свідчило про активацію резорбції кісткової тканини. Співвідношення RANKL/OPG підвищувалося до 0,09±0,007. Після введення холекальциферолу рівень ПТГ знизився на 18%, кальцій зріс на 3-4%, а ЛФ зменшилась на 25-30%.

Дефіцит вітаміну D₃ порушує кальцієво-фосфатний гомеостаз і посилює RANKL-опосередковану резорбцію кісткової тканини. Корекція холекальциферолом відновлює мінеральну рівновагу та остеоімунну регуляцію. Отримані результати підкреслюють патогенетичне значення вітаміну D₃ у підтриманні кісткового метаболізму й профілактиці гестаційних ускладнень.

Ключові слова: вагітність, щури, вітамін D₃, кальцій-фосфатний обмін, паратгормон, лужна фосфатаза, RANKL/OPG.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи кафедри акушерства і гінекології №1 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Збереження та відновлення репродуктивного здоров'я жінок в умовах швидких медико-соціальних змін», номер державної реєстрації 0123U100920.

Вступ.

Період вагітності супроводжується комплексними фізіологічними та метаболічними перебудовами в організмі жінки. Ці зміни спрямовані на забезпечення оптимальних умов для внутрішньоутробного розвитку плода, адаптації материнських органів і систем до гестаційного навантаження, а також формування ефективного плацентарного кровообігу. Зростає навантаження на серцево-судинну, дихальну, ниркову

та ендокринну системи, що вимагає відповідної перебудови метаболізму для задоволення підвищених потреб як матері, так і плода. Однією з ключових ланок цих перебудов є мінеральний обмін, зокрема регуляція рівнів кальцію, фосфору, магнію та вітаміну D₃ [1, 2]. Ці макро- і мікроелементи відіграють життєво важливу роль у формуванні скелета плода, регуляції скоротливої здатності матки, підтриманні судинного тону, забезпеченні нормальної імунної реактивності та сприяють фізіологічному ремоделюванню судин плаценти. Порушення їхнього балансу може мати низку негативних наслідків – від функціональних розладів до тяжких гестаційних ускладнень, які можуть позначитись на перебігу вагітності, пологах і стані новонародженого.

Серед цих компонентів особливу увагу привертає вітамін D₃ – біологічно активна форма вітаміну D₃, яка, окрім класичної ролі у забезпеченні кишкової абсорбції кальцію і фосфору, виконує широкий спектр функцій, включаючи модуляцію імунної відповіді, контроль експресії генів, регуляцію клітинного росту, апоптозу та ангиогенезу [3, 4]. Крім того, вітамін D бере участь у контролі секреції паратиреоїдного гормону (ПТГ), що є критичним для підтримання гомеостазу кальцію і фосфору в організмі. Відомо, що вітамін D сприяє збільшенню абсорбції кальцію й фосфору, а також бере участь у розвитку та функціонуванні кісткової тканини.

За даними міжнародних дослідницьких груп, гіповітаміноз D₃ є глобальною проблемою – понад мільярд людей мають недостатній рівень 25(OH)D [5-7]. У вагітних цей стан набуває ще більшої критичності через підвищену потребу в мікронутрієнтах, зниження часу перебування на сонці, зміни харчування та гормональні перебудови.

Порушення рівноваги у системі вітамін D₃ – кальцієвий гомеостаз веде до дестабілізації процесів кісткового ремоделювання, зокрема до активації остеокластів, зменшення остеобластичної активності та зниження загальної мінералізації кісткової тканини. При цьому важливу роль відіграє сигнальна система *receptor activator of nuclear factor κB ligand / osteoprotegerin* (RANKL/OPG): білок RANKL стимулює диференціацію остеокластів й прискорює резорбцію кістки, тоді як OPG виступає як «пастка» для RANKL і блокує його зв'язування з рецепторами на остеокластах, що інгібує резорбцію [8]. Співвідношення між цими білками розглядається як чутливий біомаркер стану кісткового метаболізму: підвищене співвідношення RANKL/OPG свідчить про переважання резорбції, знижене – про переважання кісткоутворення.

Ці питання набувають особливої актуальності у період вагітності, коли потреба в кальції та вітаміні D₃ істотно зростає в зв'язку із розвитком скелета плода та функціональною перебудовою материнського організму. Дефіцит вітаміну D₃ в цей період може призвести до остеопенії або остеомаляції у матері, затримки утворення кісткової тканини у плода, а також підвищує ризик розвитку гестаційних ускладнень – таких як преєклампсія, внутрішньоутробна затримка росту, гестаційний діабет [9]. Попри численні клінічні спостереження, що підтверджують важливість адекватного рівня вітаміну D₃ у період вагітності, механізми його дії – зокрема взаємозв'язок із системою

RANKL/OPG, кальцієво-фосфорним обміном та ПТГ – залишаються недостатньо вивченими.

Мета дослідження.

Оцінити вплив дефіциту вітаміну D₃ на співвідношення RANKL/OPG та його зв'язок із показниками кальцієво-фосфатного гомеостазу у вагітних щурів.

Об'єкт і методи дослідження.

В експериментальне дослідження було включено 35 самок білих щурів лінії Вістар віком 8-10 тижнів із середньою масою тіла 174 ± 12 г. Для оцінки впливу дефіциту вітаміну D₃ тварини були розподілені на три експериментальні групи. I група (n=14) – протягом 60 днів до спарювання тварини утримувались на спеціальній дієті з повним виключенням вітаміну D₃ для моделювання його дефіциту. II група (n=12) – на тлі аналогічного дефіцитного раціону щурам додатково призначали холекальциферол перорально (1000 МО/кг маси тіла на добу, у соняшниковій олії; Sigma, США) через зонд, починаючи за 14 днів до запліднення. Контрольна група (n=10) отримувала повноцінне стандартне харчування без обмежень вітаміну D₃.

Усі тварини перебували в умовах, що відповідали вимогам до утримання лабораторних тварин: температурний режим 22 ± 2°C, вологість 55-60%, світловий цикл – 12 годин світла/12 годин темряви, із вільним доступом до корму та води.

Проведення експерименту здійснювалося відповідно до міжнародних етичних норм щодо роботи з лабораторними тваринами, зокрема вимог Директиви 2010/63/ЄС. Протокол дослідження був попередньо схвалений Етичним комітетом НМУ імені О.О. Богомольця (Протокол №193 від 24.03.2025), із дотриманням положень Європейської конвенції з питань захисту хребетних тварин, що використовуються в наукових цілях (Страсбург, 1986), та національних біоетичних норм (Київ, 2006).

З метою підтвердження сформованого дефіциту вітаміну D₃ в тварин першої групи, наприкінці 60-денного періоду проводився забір крові для подальшого визначення рівня 25(OH)D₃ методом імуноферментного аналізу (набір General 25-Hydroxyvitamin D₃ (HVD3) ELISA kit, код UNDL00047, AssayGenie) [10]. Кількісна обробка результатів здійснювалась із використанням програмного забезпечення GainData® (arigo's ELISA Calculator).

Після лабораторного підтвердження гіповітамінозу тварин спарювали з самцями у співвідношенні 2:1. Для підтвердження факту запліднення наступного дня після контакту здійснювали мікроскопічний аналіз вагінального мазка з метою виявлення сперматозоїдів. День виявлення сперми в мазку вважався першим днем вагітності.

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) та паратгормону (ПТГ).

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 Дусе: осадження ТСА, реакція з аскорбіновою кислотою та амоній-молібдатом і вимір при 670 нм. Актив-

ність 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-фенілаланіном [11].

Рівень ПТГ визначали згідно протоколу до імуноензимної системи Rat Pth (PaRathyroid hormone) ELISA kit (RTF100259) AssayGenie. Розрахунок концентрації PTH у досліджуваних зразках виконували за допомогою GainData® (arigo's ELISA Calculator).

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення StatPlus (версія 7.0, AnalystSoft Inc., США). Для перевірки нормальності розподілу застосовували тест Шапіро-Вілکا. Порівняння середніх значень проводили методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Результати подані у вигляді середнього значення стандартного відхилення ($M \pm SD$). Рівень статистичної значущості вважався достовірним при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

В ході проведеного експериментального дослідження проаналізовано зміни основних біохімічних показників, що характеризують стан кальцієво-фосфатного обміну, активність маркерів кісткового метаболізму та функціональну активність системи RANKL/RANK/OPG у вагітних щурів з різним вітаміно- D_3 статусом. Отримані дані узагальнено у **таблицях 1 та 2**.

У тварин із дефіцитом холекальциферолу (I група), які протягом 60 днів отримували раціон без вітаміну D_3 , виявлено виражені зміни в системі регуляції мінерального обміну. Рівень ПТГ становив $325,6 \pm 12,8$ пг/мл, що достовірно перевищувало показники контрольної групи ($309,6 \pm 9,6$ пг/мл; $p < 0,05$). Таке підвищення інтерпретується як компенсаторний гіперпаратиреоз, який розвивається у відповідь на гіпокальціємію. Механізм полягає у стимуляції ПТГ секреції з метою підтримання концентрації кальцію в крові за рахунок активації остеокластів та підвищення мобілізації мінералів із кісткової тканини.

Паралельно відзначалося суттєве зниження рівня загального кальцію – $1,86 \pm 0,02$ ммоль/л проти $2,30 \pm 0,04$ ммоль/л у контролі ($p < 0,001$). Це становило лише близько 81% від фізіологічної норми, що свідчить про порушення кишкової абсорбції кальцію внаслідок зниження утворення активного метаболіту $1,25(OH)_2D_3$. Відомо, що дефіцит $25(OH)D$ у печінці знижує утворення кальцитріолу в нирках, а отже, обмежує експресію кальційзв'язувальних білків у кишковому епітелії, які забезпечують транспорт іонів кальцію через ентероцити.

Порушення кальцієвого балансу супроводжувалося зниженням неорганічного фосфату до $1,79 \pm 0,03$ ммоль/л (проти $2,15 \pm 0,03$ ммоль/л у контролі; $p < 0,01$). Це свідчить про посилення фосфатурії – підвищене виведення фосфатів із сечею під дією надлишкового ПТГ, який пригнічує їх реабсорбцію в проксимальних канальцях нефрону. У комплексі ці зміни відображають порушення фосфорно-каль-

цієвого гомеостазу як одного з ключових проявів гіповітамінозу D_3 .

Порушення метаболізму кальцію та фосфору супроводжувалося підвищенням ферментативної активності, зокрема загальної лужної фосфатази і її кісткової ізоформи, які є біохімічними маркерами ремоделювання кісткової тканини. Рівень загальної активності лужної фосфатази у I групі досягав $324,8 \pm 2,38$ ммоль/л, а кісткової ізоформи – $303,2 \pm 4,05$ ммоль/л, що значно перевищувало контрольні значення ($208,5 \pm 1,6$ та $197,3 \pm 3,04$ ммоль/л відповідно; $p < 0,001$). Висока активність лужної фосфатази пояснюється активацією остеобластів, які намагаються компенсувати втрату мінералів шляхом інтенсивного синтезу матриксних білків. Однак за дефіциту вітаміну D_3 цей процес залишається неефективним, оскільки остеоїд не мінералізується належним чином. Таким чином, підвищення активності лужної фосфатази є маркером неповноцінного остеогенезу на тлі посиленої остеорезорбції.

З точки зору морфофункціональної фізіології, така ситуація свідчить про зміщення рівноваги кісткового метаболізму в бік резорбції, що узгоджується з даними літератури [12-14]. Так, згідно з останніх досліджень, тривалий дефіцит вітаміну D_3 призводить до вторинного гіперпаратиреозу, підвищення активності активності лужної фосфатази та зниження мінералізації кісткової тканини [15].

У II групі після введення холекальциферолу спостерігалось виражене покращення біохімічного профілю. Рівень ПТГ зменшився до $265,8 \pm 8,6$ пг/мл ($p < 0,05$ порівняно з I групою), що вказує на пригнічення гіперсекреції парашитовидних залоз у відповідь на нормалізацію кальцієвого статусу. Паралельно спостерігалось поступове відновлення концентрацій кальцію ($1,92 \pm 0,02$ ммоль/л) і фосфору ($2,02 \pm 0,07$ ммоль/л), що наближалися до контрольних рівнів.

Активність лужної фосфатази суттєво знизилася – до $244,2 \pm 3,82$ ммоль/л (загальна) та $236,2 \pm 3,96$ ммоль/л (кісткова). Це свідчить про зменшення остеорезорбції та стабілізацію ремоделювання кісткової тканини. Зниження ферментативної активності лужної фосфатази після терапії холекальциферолом відображає нормалізацію процесів остеоїдного дозрівання і мінералізації, що є одним із критеріїв ефективності корекції дефіциту вітаміну D_3 .

Результати однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) підтвердили достовірні міжгрупові відмінності для всіх показників. Більше 60% варіації активності лужної фосфатази пояснюється саме станом вітаміно- D_3 забезпеченості.

Паралельно з порушенням кальцій-фосфатного обміну у Group I спостерігалася активація системи

Таблиця 1 – Особливості кальцієво-фосфатного обміну у вагітних щурів із різним вітаміно- D_3 статусом ($M \pm m$)

Показник	I група n=14	II група n=12	Контрольна група III n=10	p (ANOVA)
ПТГ, пг/мл	$325,6 \pm 12,8^*$	$265,8 \pm 8,6^{\#}$	$309,6 \pm 9,6$	0.004
Загальний кальцій, ммоль/л	$1,86 \pm 0,02^*$	$1,92 \pm 0,02^{\#}$	$2,30 \pm 0,04$	<0.001
Неорганічний фосфор, ммоль/л	$1,79 \pm 0,03^*$	$2,02 \pm 0,07^{\#}$	$2,15 \pm 0,03$	0.003
Загальна ЛФ, ммоль/л	$324,8 \pm 2,38^*$	$244,2 \pm 3,82^{\#}$	$208,5 \pm 1,6$	<0.001
Кістковий іоензим ЛФ, ммоль/л	$303,2 \pm 4,05^*$	$236,2 \pm 3,96^{\#}$	$197,3 \pm 3,04$	<0.001

Таблиця 2 – Вміст RANKL, OPG та співвідношення RANKL/OPG у сироватці крові щурів з різним вітаміном D₃ статусом (M±m)

Показник	I група n=14	II група n=12	Контрольна група III n=10	p (ANOVA)
RANKL/OPG	0.09±0.007	0.08±0.01	0.07±0.007	p<0.05
OPG, пг/мл	1538.2±57.9	1634.1±150.9	1649.0±138.8	p>0.05
RANKL, пг/мл	149.2±10.0	143.4±8.7	115.3±12.4	p<0.05

RANKL/RANK/OPG, яка є ключовим регулятором остеοїмунної взаємодії (табл. 2).

У дефіцитній групі рівень RANKL був підвищений (149,2±10,0 пг/мл) порівняно з контролем (115,3±12,4 пг/мл; p<0,05), тоді як рівень OPG залишався стабільним (1538,2±57,9 пг/мл проти 1649,0±138,8 пг/мл; p>0,05). Це призвело до підвищення співвідношення RANKL/OPG до 0,09±0,007, що свідчить про активацію остеокластогенезу та посилення резорбції кісткової тканини.

Після введення холекальциферолу концентрація RANKL знизилася до 143,4±8,7 пг/мл, а співвідношення RANKL/OPG – до 0,08±0,01, що свідчить про часткову нормалізацію остеοїмунної регуляції. ANOVA підтвердив статистично значущі відмінності для RANKL (F=5,12; p=0,011; η² =0,24) та RANKL/OPG (F=4,87; p=0,015; η² =0,23).

Механістично ці зміни можна пояснити тим, що вітамін D₃ регулює експресію генів RANKL і OPG через зв'язування з ядерними рецепторами VDR у клітинах остеобластичного ряду. За дефіциту вітаміну D₃ пригнічується синтез OPG і активується експресія RANKL, що призводить до дисбалансу між процесами остеогенезу та остеорезорбції. Відновлення вітаміну-D₃ статусу за допомогою холекальциферолу нормалізує цей баланс, що підтверджується нашими результатами.

Отримані дані мають важливе фізіологічне та клінічне значення. Дефіцит вітаміну D₃ призводить до комплексного порушення регуляторних осей: “вітамін D-ПТГ-кальцій-фосфор” та “вітамін D₃-RANKL/OPG-остеоїмунітет”. Внаслідок цього активується парашитовидна залоза, порушується мінералізація кісткової тканини, зростає резорбтивна активність остеокластів, що може призвести до остеопенії, остеомалізації та судинних кальцифікацій.

Після введення холекальциферолу спостерігається системна нормалізація метаболічних процесів, зниження гіперпаратиреоїдної активності, стабіліза-

ція кальцій-фосфатного балансу, зменшення остеокластичної активності та відновлення остеοїмунної рівноваги.

Отримані результати узгоджуються з сучасними даними літератури, які підтверджують, що вітамін D₃ є не лише регулятором кісткового метаболізму, а й плейотропним гормоном, що бере участь у регуляції ендокринних, імунних та судинних функцій [16-19]. Його активна форма впливає на експресію численних генів, модулює запальні процеси та сприяє підтриманню судинного й плацентарного гомеостазу під час вагітності.

Висновки.

Дефіцит вітаміну D₃ у вагітних щурів призводить до порушення кальцієво-фосфатного гомеостазу, розвитку компенсаторного гіперпаратиреозу та активації процесів кісткової резорбції.

Встановлено підвищення активності лужної фосфатази та зміщення співвідношення RANKL/OPG, що свідчить про активацію остеокластогенезу й дисбаланс між резорбцією та формуванням кісткової тканини.

Корекція холекальциферолом сприяє нормалізації рівня ПТГ, стабілізації кальцій-фосфатного балансу та зменшенню остеорезорбції.

Вітамін D₃ є ключовим регулятором мінерального обміну й остеοїмунної рівноваги; його дефіцит суттєво змінює активність системи RANKL/OPG, а корекція забезпечує зниження ПТГ на 18%, підвищення кальцію на 3-4% і зменшення лужної фосфатази на 25-30%, що підтверджує ефективність відновлення мінерального гомеостазу.

Отримані результати мають важливе патогенетичне та прикладне значення для розуміння ролі вітаміну D₃ у профілактиці порушень кісткового метаболізму та ускладнень вагітності, пов'язаних із його дефіцитом.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження слід спрямувати на уточнення молекулярних механізмів участі вітаміну D₃ у регуляції кальцієво-фосфатного обміну та системи RANKL/OPG під час вагітності. Перспективним є вивчення взаємозв'язку між рівнем 1,25(OH)₂D₃, FGF23, ПТГ та маркерами ендотеліальної дисфункції. Отримані результати можуть стати основою для розробки ефективних схем профілактики й корекції вітамін-D₃-дефіциту у вагітних.

References / Література

- Salles JP. Bone metabolism during pregnancy. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016;77(2):163-8. DOI: [10.1016/j.ando.2016.04.004](https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.004).
- Fischer PR, Almasri NI. Nutritional rickets-Vitamin D and beyond. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2022;219:106070. DOI: [10.1016/j.jsbmb.2022.106070](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2022.106070).
- Ryan BA, Alhani K, Sellars KB, Kirby BJ, St-Arnaud R, Kaufmann M, et al. Mineral Homeostasis in Murine Fetuses Is Sensitive to Maternal Calcitriol but Not to Absence of Fetal Calcitriol. *J Bone Miner Res*. 2019;34(4):669-680. DOI: [10.1002/jbmr.3642](https://doi.org/10.1002/jbmr.3642).
- Maekawa AS, Bennin D, Hartery SA, Kirby BJ, Poulton IJ, St-Arnaud R, et al. Maternal loss of 24-hydroxylase causes increased intestinal calcium absorption and hypercalcemia during pregnancy but reduced skeletal resorption during lactation in mice. *J Bone Miner Res*. 2024;39(12):1793-1808. DOI: [10.1093/jbmr/zjae166](https://doi.org/10.1093/jbmr/zjae166).
- Morales-Suárez-Varela M, Uçar N, Soriano JM, Llopis-Morales A, Sanford BS, Grant WB. Vitamin D-Related Risk Factors for Maternal Morbidity and Mortality during Pregnancy: Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2022;14(19):4124. DOI: [10.3390/nu14194124](https://doi.org/10.3390/nu14194124).
- Poladich IV, Gvosdiev DO. Peculiarity of vitamin D status in pregnant women. *Ukrainian Journal Health of Woman*. 2024;4(173):46-51; DOI: [10.15574/HW.2024.4\(173\).4651](https://doi.org/10.15574/HW.2024.4(173).4651).
- 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](https://doi.org/10.1002/14651858.CD008873.pub5).
- Khalaf RM, Almudhi AA. The effect of vitamin D deficiency on the RANKL/OPG ratio in rats. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2022;12(2):228-232. DOI: [10.1016/j.jobcr.2022.02.004](https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2022.02.004).
- 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](https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1406470).

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. Riasnyi VM, Apukhovska LI, Velykyi MM, Shymanskyi IO, Labudzynski DO, Komisarenko SV. Immunomodulatory effects of vitamin D3 and bisphosphonates in nutritional osteoporosis in rats. *Ukr Biokhim Zh*. 2012;84(2):73-80.
12. Lisakovska O, Shymanskyi I, Labudzynski D, Mazanova A, Velyky M. Vitamin D auto-/paracrine system is involved in modulation of glucocorticoid-induced changes in angiogenesis/bone remodeling coupling. *Int J Endocrinol*. 2020;2020:8237610. DOI: [10.1155/2020/8237610](https://doi.org/10.1155/2020/8237610).
13. Fleet JC. Vitamin D-Mediated Regulation of Intestinal Calcium Absorption. *Nutrients*. 2022;14(16):3351. DOI: [10.3390/nu14163351](https://doi.org/10.3390/nu14163351).
14. Voulgaris N, Papanastasiou L, Piaditis G, Angelousi A, Kaltsas G, Mastorakos G, et al. Vitamin D and aspects of female fertility. *Hormones (Athens)*. 2017;16(1):5-21. DOI: [10.14310/horm.2002.1715](https://doi.org/10.14310/horm.2002.1715).
15. 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):29-42. DOI: [10.1530/REP-16-0386](https://doi.org/10.1530/REP-16-0386).
16. Mazanova AO, Makarova OO, Khomenko AV, Vasylevska VM, Lototska OYu, Shymanskyi IO, et al. The impact of vitamin D₃ on bone remodeling in different types of experimental pathology. *Ukr Biochem J*. 2022;94(3):5-15. DOI: [10.15407/ubj94.03.005](https://doi.org/10.15407/ubj94.03.005).
17. 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](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105669).
18. Walsh MC, Choi Y. Regulation of T cell-associated tissues and T cell activation by RANKL-RANK-OPG. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2021;39(1):54-63. DOI: [10.1007/s00774-020-01178-y](https://doi.org/10.1007/s00774-020-01178-y).
19. Navet B, Vargas-Franco JW, Gama A, Amiaud J, Choi Y, Yagita H, et al. Maternal RANKL Reduces the Osteopetrotic Phenotype of Null Mutant Mouse Pups. *Journal of clinical medicine*. 2018;7(11):426. DOI: [10.3390/jcm7110426](https://doi.org/10.3390/jcm7110426).

ВПЛИВ ДЕФІЦИТУ ВІТАМІНУ D₃ НА КАЛЬЦІЄВО-ФОСФАТНИЙ ОБМІН ТА СПІВВІДНОШЕННЯ RANKL/OPG В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Поладич І. В., Авраменко С. О.

Резюме. Дефіцит вітаміну D₃ у період вагітності є одним із ключових чинників порушення кальцієво-фосфатного гомеостазу та остеоімунної рівноваги. В умовах зростання метаболічних потреб матері та плода недостатність холекальциферолу спричинює дисбаланс у системі «вітамін D₃ – кальцієво-фосфатний гомеостаз – RANKL/OPG», що призводить до компенсаторного гіперпаратиреозу, активації остеокластогенезу та зниження ефективності мінералізації кісткової тканини.

Мета: оцінити вплив дефіциту вітаміну D₃ на співвідношення RANKL/OPG та показники кальцієво-фосфатного гомеостазу у вагітних щурів.

Експеримент проведено на 36 самках щурів лінії Вістар, розподілених на три групи: I – дефіцит вітаміну D₃, II – дефіцит із наступною корекцією холекальциферолом, III – контроль. У сироватці крові визначали рівні паратгормону, кальцію, неорганічного фосфору, загальної та кісткової лужної фосфатази, RANKL та OPG методом ELISA. Статистичний аналіз виконано з використанням ANOVA.

У групі дефіциту D₃ (I група) зафіксовано достовірне підвищення рівня ПТГ (325,6±12,8 пг/мл; p<0,05), що свідчить про розвиток компенсаторного гіперпаратиреозу на тлі гіпокальціємії. Концентрація загального кальцію була знижена до 1,86±0,02 ммоль/л (на 19% нижче контрольних значень; p<0,001), тоді як рівень неорганічного фосфату зменшився до 1,79±0,03 ммоль/л (p<0,01), що відображає фосфатуричний ефект надлишкового ПТГ. Активність загальної та кісткової лужної фосфатази підвищилася в 1,5 раза порівняно з контролем (p<0,001), що вказує на активацію остеобластів при зниженій ефективності мінералізації. Після введення холекальциферолу (група II) спостерігалось суттєве покращення біохімічного профілю: рівень ПТГ знизився на ~18%, концентрація кальцію зросла до 1,92±0,02 ммоль/л, а фосфору – до 2,02±0,07 ммоль/л. Активність лужної фосфатази зменшилася на 25-30%, що свідчить про зниження остеорезорбції та стабілізацію ремоделювання кісткової тканини. Паралельно встановлено достовірні зміни у системі RANKL/OPG: при дефіциті D₃ рівень RANKL зріс до 149,2±10,0 пг/мл (p<0,05), тоді як OPG залишався стабільним (~1,6 нг/мл). Це призвело до зростання співвідношення RANKL/OPG до 0,09±0,007 (проти 0,07±0,007 у контролі), що вказує на посилену остеокластичну активність. Після корекції холекальциферолом ці показники нормалізувалися: RANKL зменшився до 143,4±8,7 пг/мл, а RANKL/OPG – до 0,08±0,01, що свідчить про відновлення остеоімунної рівноваги.

Дефіцит вітаміну D₃ призводить до виражених метаболічних зрушень, активації системи RANKL/OPG та гіперпаратиреоїдної відповіді, тоді як корекція холекальциферолом сприяє нормалізації кальцієво-фосфатного балансу, зниженню ПТГ і ферментативної активності лужної фосфатази. Отримані результати підтверджують регуляторну роль вітаміну D₃ у підтриманні мінерального обміну та можуть слугувати експериментальним обґрунтуванням для розробки профілактичних стратегій гестаційних ускладнень.

Ключові слова: вагітність, щури, вітамін D₃, кальцій-фосфатний обмін, паратгормон, лужна фосфатаза, RANKL/OPG.

THE EFFECTS OF VITAMIN D₃ DEFICIENCY ON CALCIUM–PHOSPHATE HOMEOSTASIS AND THE RANKL/OPG REGULATORY SYSTEM: EXPERIMENTAL STUDY

Poladych I. V., Avramenko S. O.

Abstract. Vitamin D₃ deficiency during pregnancy is one of the key factors disrupting calcium-phosphate homeostasis and osteoimmune balance. Under conditions of increased metabolic demands of the mother and fetus, cholecalciferol insufficiency induces an imbalance within the “vitamin D₃ – calcium-phosphate homeostasis – RANKL/OPG” system, leading to compensatory hyperparathyroidism, activation of osteoclastogenesis, and reduced efficiency of bone tissue mineralization.

The aim is to evaluate the effect of vitamin D₃ deficiency on the RANKL/OPG ratio and the parameters of calcium–phosphate homeostasis in pregnant rats.

The experiment was conducted on 36 female Wistar rats divided into three groups: Group I – vitamin D₃ deficiency, Group II – deficiency followed by cholecalciferol correction, and Group III – control. Serum levels of parathyroid

hormone (PTH), calcium, inorganic phosphorus, total and bone alkaline phosphatase, RANKL, and OPG were measured using the ELISA method. Statistical analysis was performed using ANOVA.

In the vitamin D₃ deficiency group (Group I), a significant increase in parathyroid hormone (PTH) levels was recorded (325.6 ± 12.8 pg/mL; $p < 0.05$), indicating the development of compensatory hyperparathyroidism against the background of hypocalcemia. The total calcium concentration decreased to 1.86 ± 0.02 mmol/L (19% lower than control values; $p < 0.001$), while the level of inorganic phosphate declined to 1.79 ± 0.03 mmol/L ($p < 0.01$), reflecting the phosphaturic effect of excessive PTH. The activity of total and bone alkaline phosphatase increased 1.5-fold compared with controls ($p < 0.001$), suggesting osteoblast activation under conditions of reduced mineralization efficiency. Following cholecalciferol administration (Group II), a substantial improvement in the biochemical profile was observed: PTH levels decreased by approximately 18%, calcium concentration rose to 1.92 ± 0.02 mmol/L, and phosphorus to 2.02 ± 0.07 mmol/L. Alkaline phosphatase activity decreased by 25-30%, indicating reduced osteoresorption and stabilization of bone tissue remodeling. Simultaneously, significant alterations were detected in the RANKL/OPG system. Under vitamin D₃ deficiency, RANKL levels increased to 149.2 ± 10.0 pg/mL ($p < 0.05$), while OPG remained stable (≈ 1.6 ng/mL). This resulted in an elevated RANKL/OPG ratio (0.09 ± 0.007 vs. 0.07 ± 0.007 in controls), indicating enhanced osteoclastic activity. After cholecalciferol correction, these parameters normalized: RANKL decreased to 143.4 ± 8.7 pg/mL, and the RANKL/OPG ratio dropped to 0.08 ± 0.01 , reflecting restoration of osteoimmune balance.

Vitamin D₃ deficiency leads to pronounced metabolic disturbances, activation of the RANKL/OPG system, and a hyperparathyroid response, whereas correction with cholecalciferol promotes normalization of calcium-phosphate balance, reduction of parathyroid hormone levels, and decreased enzymatic activity of alkaline phosphatase. The obtained results confirm the regulatory role of vitamin D₃ in maintaining mineral metabolism and may serve as experimental evidence for the development of preventive strategies against gestational complications.

Key words: pregnancy, rats, vitamin D₃, calcium-phosphate metabolism, parathyroid hormone, alkaline phosphatase, RANKL/OPG.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Poladych I. V.: <https://orcid.org/0000-0002-8494-2534> ^{ABCDEF}

Avramenko S. O.: <https://orcid.org/0000-0001-9079-4219> ^{ABEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Poladych Iryna Volodymyrivna / Поладич Ірина Володимирівна

Bogomolets National Medical University / Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Ukraine, 03150, Kyiv, 9 Predslavinska str. / Адреса: Україна, 03150, м. Київ, вул. Предславинська 9

Tel.: 0974668872 / Тел.: 0974668872

E-mail: iren.poladich@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 17.07.2025 / Стаття надійшла 17.07.2025 року
Accepted 10.11.2025 / Стаття прийнята до друку 10.11.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-4-179-186-194

UDC 616.34-008.87-092

Pryima M. O., Fedorov S. V.

IMMUNO-INFLAMMATORY INDICES IN PATIENTS WITH STABLE CORONARY ARTERY DISEASE AND CONCOMITANT INTESTINAL DYSBIOSIS

State Institution “Ivano-Frankivsk National Medical University” (Ivano-Frankivsk, Ukraine)

markianpriyima91@gmail.com

Disturbance of gut microbiota balance is considered an important factor capable of modifying the course of cardiovascular diseases, particularly stable coronary artery disease (CAD). This paper presents the results of a study aimed at determining the relationship between intestinal dysbiosis and key immuno-inflammatory indices that reflect the activity of low-grade chronic inflammation, which in turn is a provoking factor for the development and progression of coronary atherosclerosis. The analysis included 49 individuals with stable CAD, among whom varying degrees of dysbiotic changes were detected in a subset of patients. The evaluation was based on complete blood count parameters with calculation of SIRI, NLR, and MLR, as well as assessment of gut microbiota composition. Comparison between groups demonstrated differences in systemic inflammatory response levels: patients with dysbiosis had higher SIRI and NLR values. Moreover, a gradual increase in SIRI was observed with increasing severity of microbial imbalance, indirectly indicating a dose-dependent influence of dysbiosis on the activation of immuno-inflammatory mechanisms. An interesting finding was the higher prevalence of prior myocardial infarction among patients