

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ РЕЦЕПТОРОВ К ВИТАМИНУ D В МИОМЕТРИИ У ПАЦИЕНТОК С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Васильева Э.Н.¹, Гунин А.Г.², Денисова Т.Г.¹, Герасимова Л.И.¹, Винокур Л.И.³

¹АУ Чувашии «Институт усовершенствования врачей» Минздравсоцразвития Чувашии, Чебоксары, Россия, e-mail: ipiuv@midinform.su;

²ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», Чебоксары, Россия, e-mail: office@chuvsu.ru;

³БУ «Новочебоксарский медицинский центр» Минздравсоцразвития Чувашии, Новочебоксарск, Россия, e-mail: nmc@med.cap.ru

Витамин D – важный прегормон, участвующий во многих метаболических процессах. Выявлена связь дефицита витамина D с длительным течением многих заболеваний. В разнообразных тканях витамин D оказывает свое действие путем связывания с рецептором витамина D (VDR), стероидом ядерного рецептора и внутриклеточного фактора транскрипции. Регуляция экспрессии VDR является одним из основных механизмов, посредством которых клетки-мишени реагируют на кальцитриол. Проведено исследование обеспеченности миометрия рецепторами к витамину D у пациенток с физиологическим течением беременности и преэклампсией. Выявление рецепторов витамина D3 производили непрямым иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных кроличьих антител. Выявлено, что у пациенток с преэклампсией наблюдается снижение экспрессии рецепторов витамина D3 в миоцитах миометрия.

Ключевые слова: витамин D, экспрессия рецепторов витамина D, преэклампсия, иммуногистохимический метод.

PECULIARITIES OF VITAMIN D RECEPTORS'CONTENT IN THE MYOMETRIUM IN PATIENTS WITH PRE-ECLAMPSIA

Vasilyeva E.N.¹, Gunin A.G.², Denisova T.G.², Gerasimova L.I.², Vinokur L.I.¹

¹AI of Chuvashia "Postgraduate Doctors' Training Institute" of Health Care and Social Development Ministry of Chuvashia, Cheboksary, Russia, e-mail: ipiuv@midinform.su;

²FSBEI HPE «the Chuvash State University named after I.N. Ulyanov», Cheboksary, Russia, e-mail: office@chuvsu.ru;

³BI "Novocheboksarskiy Medical Center" Health Ministry of Chuvashia, Novocheboksarsk, Russia, e-mail: nmc@med.cap.ru

Vitamin D is an important prehormone involved in many metabolic processes. The following has been detected: connection of vitamin D deficiency with a long term of many diseases. In various tissues Vitamin D reveals its action by binding to vitamin D receptors (VDR), nuclear steroid receptor and the intracellular transcription factor. The regulation of VDR expression is one of the major mechanisms by which target cells react to calcitriol. The study of myometrium of vitamin D receptors content in patients with normal pregnancy and preeclampsia. Detection of vitamin D3 receptor has been made indirectly by immunohistochemical method using polyclonal rabbit antibodies. It is revealed that, in patients with preeclampsia there is a decrease of vitamin D3 receptor's expression in muscle cells of the myometrium.

Keywords: Vitamin D, vitamin D3 receptor's expression, preeclampsia, immunohistochemical method.

Витамин D был открыт Виндаусом в начале 30-х годов прошлого столетия. Известны 2 различные формы витамина D – эргокальциферол (витамин D2, который был открыт первым) и холекальциферол (витамин D3). Витамин D2 абсорбируется преимущественно из обогащенных пищевых продуктов. Физиологический уровень витамина D3 зависит от его поступления с пищей, а также от процессов его биосинтеза из 7-дегидро-холестерола в глубоко расположенных и активно растущих слоях эпидермиса под влиянием УФ солнечных лучей. Доказано, что 1 млрд человек во всем мире имеет дефицит витамина D или его

недостаточность. Многие факторы влияют на статус витамина D. Самой частой причиной недостаточности или дефицита витамина D является его недостаточное поступление в организм [1; 6; 9; 10].

В разнообразных тканях витамин D оказывает свое действие путем связывания с рецептором витамина D (VDR), стероидом ядерного рецептора и внутриклеточного фактора транскрипции. Регуляция экспрессии VDR является одним из основных механизмов, посредством которых клетки-мишени реагируют на кальцитриол так, что полиморфизмы этого рецептора изменяют обычный режим функционирования [8; 11].

Геномное действие $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ опосредуется рецепторами VDR, которые функционируют в качестве лиганд-активированных факторов транскрипции в клетках тканей-мишеней. VDR является белком, который с высокой аффинностью и специфичностью связывает $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Присутствует в большинстве известных человеку тканей. Последовательность событий, участвующих в регуляции транскрипции гена на VDR, представляет собой связывание $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в VDR в цитозоле, транслокацию гормон-рецепторного комплекса в ядро, связывание VDR-RXR гетеродимеров, реже, VDR гомодимеров, с Response Vitamin D element (VDRE), инициация ядерных белков для транскрипции. Таким образом, VDRE функционирует в качестве усилителя транскрипции. Но нужно иметь в виду, что увеличение уровня мРНК не обязательно для усиления транскрипции: повышение мРНК просто приведет к ее накоплению [4; 13].

Материнский (децидуальный) и плацентарный (трофобластический) компоненты плаценты имеют рецепторы к витамину D. Сывороточные уровни витамин D связывающего белка увеличиваются от 46 до 103% во время беременности, предполагая, что рецепторы к витамину D могут играть роль в управлении метаболизмом витамина D во время беременности. Развитие и формирование плаценты играет важную роль в благополучном течении беременности, и материнский дефицит витамина D может обусловить неблагоприятные исходы [7; 12; 14; 15].

Исследование статуса витамина D у пациенток с преэклампсией показало наличие дефицита [2; 3; 5], и нами было решено изучить наличие рецепторов к витамину D в матке.

Цель исследования: изучить обеспеченность миометрия рецепторами к витамину D у пациенток с физиологическим течением беременности и преэклампсией.

Материалы и методы. Объектом исследования служили кусочки миометрия размером 1x0,5 см, полученные с края операционного разреза на матке во время выполнения операции кесарева сечения. Проведение исследования одобрено этическим комитетом

медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова. Для исследования был использован материал от 26 женщин со сроком беременности 38-39 недель, которым производилось плановое кесарево сечение. 12 пациенток составили контрольную группу, 14 – опытную.

Пациентки контрольной группы были в возрасте 26-32 лет, имели срок беременности 38-39 недель. Первые роды были у 6 из них, повторные – также у 6. Показаниями к операции кесарева сечения у пациенток контрольной группы были: наличие кесарева сечения в анамнезе (4 случая), наличие миопии высокой степени (5 случаев), предполагаемый крупный плод в сочетании с анатомически узким тазом (3 случая). У пациенток контрольной группы не было выявлено клинических или лабораторных признаков преэклампсии.

Пациентки опытной группы были в возрасте 26-34 лет, имели срок беременности 38-39 недель. Первые роды были у 8 из них, повторные – у 6. Показаниями к операции кесарево сечение у пациенток опытной группы была умеренная преэклампсия в сочетании с наличием кесарева сечения в анамнезе (6 случаев), наличие умеренной преэклампсии в сочетании с миопией высокой степени (3 случая), тяжелая преэклампсия (5 случаев).

Кусочки миометрия сразу после извлечения фиксировали погружением в 10%-ный забуференный раствор формалина (рН 7,2-7,4) при комнатной температуре в течение 24 часов. Затем образцы промывали в проточной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Из залитых в парафин тканевых блоков при помощи микротомы изготавливали поперечные срезы толщиной 5-7 мкм, которые помещали на предметные стекла, предварительно смазанные раствором полилизина. Срезы на предметных стеклах затем подсушивались в термостате при температуре 37 °С в течение двух суток.

Выявление рецепторов витамина D₃ производили непрямым иммуногистохимическим методом. Сначала срезы регидратировали, затем проводили инактивацию эндогенной пероксидазы путем помещения препаратов в 0,1%-ный раствор перекиси водорода на 10 мин. Далее срезы промывали в дистиллированной воде 2 раза по 5 мин и в трех порциях 0,05 М трис-буфера с добавлением 0,15 М натрия хлорида (TBS) с рН 7.2-7.6. Затем срезы инкубировали в поликлональных кроличьих антителах против рецептора витамина D₃ (GTX104615, GeneTex, Inc, США) в разведении 1:50 в TBS с добавлением 0,1%-ного тритона X-100 в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем следовала промывка в трех порциях TBS по 20 мин в каждой. Далее производили инкубацию в антикроличьей визуализирующей системе EnVision+, конъюгированной с пероксидазой (К 4002, DakoCytomation, Дания). Выявление специфического связывания антител производили путем выявления пероксидазы с применением 3,3-диаминобензидина (Sigma Chemical, США).

Результатом данной процедуры было окрашивание продукта реакции в коричневый цвет. В качестве контроля специфичности иммуногистохимического окрашивания проводилась та же схема обработки срезов, но с нормальной кроличьей сывороткой в конечной концентрации 1%. При исследовании данной схемы ни разу не было получено специфического окрашивания. Результаты оценивали путем визуального определения интенсивности иммуногистохимического окрашивания с помощью светового микроскопа Olympus CX-21, цифровой камеры Olympus Camedia 4040z. Интенсивность окраски определяли вслепую без исходных данных о пациентках. Интенсивность окраски определяли: как слабую – светло-коричневое окрашивание, среднюю - коричневое окрашивание и сильную – темно-коричневое окрашивание. Достоверность отличий в интенсивности окрашивания структур миометрия на рецепторы витамина D3 определяли с помощью критерия хи-квадрат. Отличия $P < 0,05$ считали достоверными.

Результаты. Рецепторы витамина D3 нами были выявлены в виде коричневого окрашивания ядер с разной степенью интенсивности. В препаратах как опытной, так и контрольной группы рецепторы витамина D3 были обнаружены в ядрах гладкомышечных клеток миометрия, в ядрах фибриобластов межмышечной соединительной ткани, в ядрах эндотелиальных, гладкомышечных и соединительнотканых клеток кровеносных сосудов.

В препаратах опытной группы (пациентки с преэклампсией) специфическое окрашивание ядер гладкомышечных клеток миометрия на рецепторы витамина D3 в 8 случаях из 14 выглядело светло-коричневым и было расценено как слабое (57,14%). В 4 случаях окрашивание ядер миометрия на рецепторы витамина D3 было квалифицировано как среднее (28,57%). Ядра миоцитов миометрия этих пациенток имели коричневое окрашивание. У 2 пациенток опытной группы окрашивание ядер миоцитов миометрия на рецепторы витамина D3 имело более интенсивный характер и было квалифицировано как сильное (14,29%). Ядра миоцитов миометрия этих двух пациенток выглядели темно-коричневыми.

В срезах миометрия пациенток контрольной группы (беременные без преэклампсии) ядра гладкомышечных клеток миометрия после окраски на рецепторы витамина D3 в 2 случаях из 12 выглядели светло-коричневыми, а окрашивание было расценено как слабое (16,67%). У 6 пациенток контрольной группы окрашивание ядер миоцитов миометрия на рецепторы витамина D3 выглядело коричневым и квалифицировано как среднее (50,00%). В остальных 4 случаях окрашивание ядер миоцитов миометрия пациенток контрольной группы на рецепторы витамина D3 было расценено как сильное (33,33%). Ядра миоцитов миометрия данных пациенток имели темно-коричневое окрашивание (рис. 1).

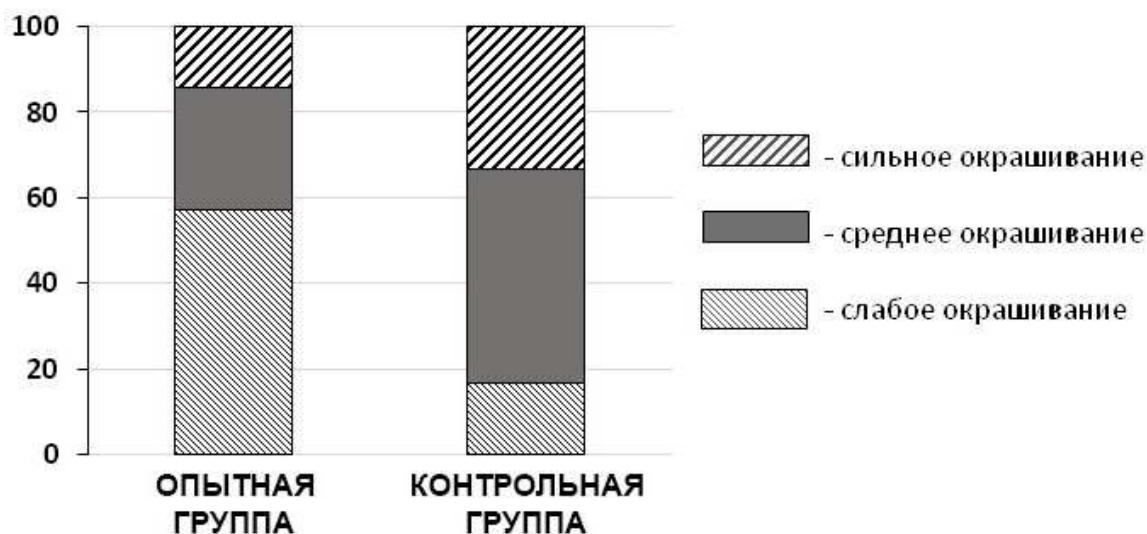


Рис. 1. Количество случаев с разной степенью окрашивания ядер миоцитов миометрия на рецепторы витамина D3 у пациенток с преэклампсией в опытной группе и без преэклампсии в контрольной группе ($P < 0,001$; критерий хи-квадрат)

Таким образом, исследование рецепторов витамина D3 в ядрах миоцитов миометрия показало, что у пациенток с преэклампсией ядра с сильной и средней степенью окрашивания встречаются реже, чем у пациенток без преэклампсии. Следовательно, при наличии преэклампсии наблюдается снижение экспрессии рецепторов витамина D3 в миоцитах миометрия. Сравнение результатов опытной и контрольной группы с помощью критерия хи-квадрат выявило высокую степень достоверности отличий (критерий хи-квадрат 70,12; $P < 0,001$).

Список литературы

1. Васильева Э.Н., Денисова Т.Г., Гунин А.Г., Тришина Е.Н. Дефицит витамина D во время беременности и грудного вскармливания // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. - URL: <http://www.science-education.ru/127-21135> (дата обращения: 05.08.2015).
2. Денисова Т.Г., Васильева Э.Н., Шамитова Е.Н., Ассанский В.Г. Обеспеченность витамином D пациенток с преэклампсией // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4.
3. Ших Е.В., Милотова Н.М. роль полиморфизма гена VDR, кодирующего рецептор витамина D, в патогенезе артериальной гипертонии // Биомедицина. – 2009. – Т. 1, № 1. – С. 55-67.

4. Alpert P.T., Shaikh U. The effects of vitamin D deficiency and insufficiency on the endocrine and paracrine systems // *Biological Research for Nursing*. – 2007. – Vol. 9, №. 2. – P. 117-129. DOI: 10.1177/1099800407308057.
5. Holick M.F. Medical progress: vitamin D deficiency // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol. 357, N. 3. – P. 266-281. DOI: 10.1056/NEJMra070553.
6. Holmes V.A., Barnes M.S., Alexander H.D., McFaul P., Wallace J.M.W. Vitamin D deficiency and insufficiency in pregnant women: A longitudinal study // *British Journal of Nutrition*. – 2009. – Vol. 102, N. 6. – P. 876-881. DOI: 10.1017/S0007114509297236.
7. Lapillonne A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes // *Medical Hypotheses*. – 2010. – Vol. 74, N. 1. – P. 71-75. DOI: 10.1016/j.mehy.2009.07.054.
8. Lanham-New S.A., Buttriss J.L., Miles L.M., et al. Proceedings of the rank forum on vitamin D // *British Journal of Nutrition*. – 2011. – Vol. 105, N. 1. – P. 144-156. DOI: 10.1017/S0007114510002576.
9. Datta S., Alfaham M., Davies D.P., et al. Vitamin D deficiency in pregnant women from a non-European ethnic minority population – An interventional study // *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. – 2002. – Vol. 109, no. 8. – P. 905-908. DOI: 10.1016/S1470—0328 (02) 01171-0.
10. Heaney R.P. Vitamin D in health and disease // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. – 2008. – Vol. 3, N. 5. – P. 1535-1541. DOI: 10.2215/CJN.01160308.
11. Lewis S., Lucas R.M., Halliday J., Ponsonby A. -L. Vitamin D deficiency and pregnancy: From preconception to birth // *Molecular Nutrition and Food Research*. – 2010. – Vol. 54, N. 8. – P. 1092-1102. DOI: 10.1002/mnfr.201000044.
12. Lucas R.M., Ponsonby A. -L., Pasco J.A., Morley R. Future health implications of prenatal and early-life vitamin D status // *Nutrition Reviews*. – 2008. – Vol. 66, N. 12. – P. 710-720. DOI: 10.1111/j.1753—4887.2008.00126.x.
13. Halloran B.P., Deluca H.F. Influence of vitamin D deficiency on fertility and reproductive ability in the female rat // *Journal of Nutrition*. – 1980. – Vol. 110, N. 8, P. 1573-1580.
14. Bodnar L.M., Catov J.M., Simhan H.N. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2007. – Vol. 92, N. 9. – P. 3517-3522. DOI: 10.1210/jc.2007—0718.
15. Liu N.Q., Kaplan A.T., Lagishetty V., et al. Vitamin D and the regulation of placental inflammation // *Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186, N. 10. – P. 5968-5974. DOI: 10.4049/jimmunol.1003332.

Рецензенты:

Сергеева В.Е., д.м.н., профессор, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары;

Алексеев Г.А., д.м.н., профессор кафедры общественного здоровья и здравоохранения АУ Чувашии «Институт усовершенствования врачей» Минздравсоцразвития Чувашии, г. Чебоксары.