

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М.І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ОСТРЕНЮК РОМАН СЕРГІЙОВИЧ

УДК: 616.12:546.221:577.161.2:569.323.4:616-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ ВІТАМІНУ D В РЕГУЛЯЦІЇ МЕТАБОЛІЗМУ ГІДРОГЕН
СУЛЬФІДУ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ ТА
МЕХАНІЗМАХ H₂S-ЗАЛЕЖНОЇ КАРДІОПРОТЕКЦІЇ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

091 «Біологія та біохімія»

09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
___(підписано ЕП)___ Р.С. Остренюк

Науковий керівник: Заїчко Наталія Валентинівна, доктор медичних наук,
професор

Вінниця – 2026

АНОТАЦІЯ

Остренюк Р.С. Роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфід у серцево-судинній системі щурів та механізмах H_2S -залежної кардіопротекції (експериментальне дослідження). Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю – 091 «Біологія та біохімія». – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2026.

У дисертації розглянуто та вирішено наукове завдання, яке полягало у встановленні ролі вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфід (H_2S) в серцево-судинній системі щурів та механізмах H_2S -залежної кардіопротекції за дієтичного ожиріння в експерименті.

Досліди виконані на 235 білих лабораторних щурах-самцях популяції Вістар із дотриманням принципів біоетики відповідно до Директив Ради Європи (Directive 2010/63/EU), інших міжнародних і вітчизняних нормативно-правових актів, що засвідчено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол №9 від 01.11.2018, №4 від 18.03.2026). Для виконання завдань дисертаційного дослідження було проведено три серії експериментів: встановлення впливу активної форми вітаміну D - кальцитріолу ($1,25(OH)_2D_3$) у різних дозах на показники метаболізму H_2S та експресію гена *CSE* в серцево-судинній системі щурів; визначення впливу кальцитріолу на медіатори запалення, апоптозу, маркери оксидативного стресу в міокарді, сироваткові маркери дисфункції ендотелію, морфологічний стан аорти за умов модуляції системи H_2S / цистатіонін- γ -ліаза (*CSE*); дослідження впливу модуляторів системи H_2S / *CSE* на кардіопротекторні ефекти кальцитріолу за умов ожиріння (ДІО), індукованого висококалорійною дієтою з високим вмістом жирів.

З результатами дослідження було вперше з'ясовано особливості впливу кальцитріолу на різні шляхи сульфідного обміну в серцево-судинній системі щурів залежно від дози та тривалості застосування. Показано, що введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 0,1 мкг/кг упродовж 28 діб спричиняло в міокарді та аорті здорових статевозрілих щурів зростання рівня H_2S (на 52,8 та 37,1 %, $p < 0,01$), підвищення (в 1,3-1,4 рази, $p < 0,05$) активності ензимів синтезу H_2S - цистатіонін- γ -ліази (CSE), цистеїнамінотрансферази/ 3-меркаптопіруват-сульфуртрансферази (CAT/ 3-MST), тіосульфаттіолсульфуртрансферази (TST) без суттєвих змін активності ензимів мітохондріальних шляхів обміну H_2S - тіоредоксинредуктази (TrxR), сульфітоксидази (SO). Введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 1 мкг/кг справляло стимулюючий вплив на сульфідний обмін в міокарді та аорті щурів упродовж перших 14-ти діб, але в подальшому викликало зниження активності H_2S -синтезуючих ензимів із розвитком дисбалансу у шляхах CSE та CAT/3-MST (зі зниженням коефіцієнту CSE/CAT в 1,4-1,5 рази, $p < 0,05$); зниженням (в 1,2-1,3 рази, $p < 0,05$) активності мітохондріальних ензимів (TST, TrxR, SO); формуванням дефіциту H_2S .

Встановлено, що кальцитріол у фізіологічній та високій дозі викликає різновекторні зміни експресії гена CSE в серцево-судинній системі щурів. Так, введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 0,1 мкг/кг викликало підвищення відносного рівня мРНК CSE / Actb в міокарді та аорті (на 34,2 % 38,8 % ($p < 0,01$) станом на 28-му добу. Натомість, застосування $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в дозі 1 мкг/кг викликало пригнічення експресії гена CSE: відносний рівень мРНК CSE / Actb в міокарді та аорті виявився статистично значуще нижчим (на 37,2 % та 32,6 %, $p < 0,01$), ніж в групі контролю. Зміни експресії гена CSE за дії різних доз кальцитріолу узгоджувались зі змінами десульфуразної активності цього ензиму. Таким чином, кальцитріол залучений до регуляції біосинтезу H_2S на рівні експресії гена CSE в серцево-судинній системі щурів із стимулюючим ефектом у фізіологічній дозі та інгібуючим ефектом у високій дозі.

Показано, що система $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ інтегрована в механізми біологічної дії активної форми вітаміну D, а її модулятори суттєво модифікують серцево-

судинні ефекти кальцитріолу. Введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 0,1 мкг/кг упродовж 4-х тижнів не спричиняло суттєвих змін в міокарді здорових щурів, натомість у дозі 1 мкг/кг викликало підвищення рівнів прозапальних, проапоптичних медіаторів – $\text{TNF}\alpha$, каспази-3 (на 28,3; 25,3 %, $p < 0,01$), зниження рівня антиапоптичного цитопротекторного протеїну теплового шоку Hsp70 (на 17,2 %, $p < 0,05$), зменшення коефіцієнту Hsp70 / Hsp60 (на 23,2 %, $p < 0,01$); підвищення маркерів оксидативного стресу - МДА та карбонільних груп протеїнів (на 48,2 та 50 %, $p < 0,001$). Модулятори системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ достовірно модифікували міокардіальні ефекти кальцитріолу: інгібітор CSE пропаргілгліцин (ППГ) посилював (у 1,5-2,2 рази, $p < 0,001$) прозапальну, проапоптичну, прооксидантну дію високої дози $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, а донор NaHS, навпаки, зменшував ці ефекти. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 0,1 мкг/кг зменшував кардіотоксичну дію ППГ і, за поєднання з NaHS, забезпечував помірне підвищення рівня Hsp70 (на 12,5 %, $p < 0,05$) та зниження рівня каспази-3 (на 19,1 %, $p < 0,05$). Між рівнем H_2S та рівнем $\text{TNF}\alpha$, каспази-3 в міокарді виявлялись сильні обернені кореляційні зв'язки ($r_{sp} = -0,61$; $-0,76$, $p < 0,001$) і прямий зв'язок – з рівнем Hsp70 ($r_{sp} = 0,60$, $p < 0,001$).

Введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 0,1 мкг/кг упродовж 28 діб не викликало суттєвих змін стану аорти здорових щурів, але у дозі 1 мкг/кг спричинило підвищення сироваткового рівня ендотеліну-1 (на 126,3 %, $p < 0,001$), мікроскопічні ознаки пошкодження судинного ендотелію, потовщення внутрішньої еластичної мембрани, зміни гладком'язових клітин. ППГ посилював вазотоксичний вплив високої дози $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, оскільки суттєво знижував рівень H_2S в аорті (на 67,7 %, $p < 0,001$), стимулював зростання рівня ендотеліну-1 (на 174,6 %, $p < 0,001$), поглиблював морфологічні зміни судинної стінки, натомість введення NaHS справляло вазопротекторний ефект.

Встановлено особливості впливу кальцитріолу на стан системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ в серцево-судинній системі щурів з ДІО в умовах введення ППГ та NaHS. У щурів з ДІО в міокарді та аорті реєструвалось зниження рівня H_2S (в 1,3 рази, $p < 0,001$) та активності CSE (в 1,2-1,4 рази, $p < 0,05$), відповідно. Застосування

1,25 (OH)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг викликало достовірне підвищення рівня H₂S та активності CSE (на 1,22-1,48 рази, p<0,05) в міокарді та аорті щурів з ДІО. Введення ППГ нівелювало вплив 1,25 (OH)₂D₃ на активність CSE і поглиблювало дефіцит H₂S в міокарді та аорті щурів з ДІО. Натомість, NaHS підсилював стимулюючий вплив 1,25 (OH)₂D₃ на систему H₂S/ CSE і запобігав розвиток дефіциту H₂S в міокарді та аорті у щурів з ДІО.

Вперше доведено участь системи H₂S/ CSE у механізмах регуляторного впливу кальцитріолу на рівні медіаторів запалення, апоптозу, ЕПР-стресу в міокарді (каспази-3, TNFα, Hsp70, Hsp60), медіаторів дисфункції ендотелію та атерогенезу (ендотеліну-1 та вісфатину) в сироватці крові у щурів з ДІО. Так, у щурів з ДІО спостерігалось підвищення рівня каспази-3, TNFα, Hsp60 (в 1,34-2,1 рази, p<0,01), зниження рівня Hsp70 (в 1,2 рази, p<0,05), підвищення рівня МДА та карбонільних груп (в 1,6-1,7 рази, p<0,01) в міокарді, підвищення рівнів ендотеліну-1 та вісфатину в сироватці крові (в 1,96-2,1 рази, p<0,001). Введення 1,25 (OH)₂D₃ забезпечувало зниження рівнів каспази-3, TNFα, Hsp60 (в 1,2-1,3 рази, p<0,05), підвищення рівня Hsp70 (в 1,24 рази, p<0,05), зменшення ознак оксидативного стресу в міокарді, зниження сироваткових рівнів ендотеліну-1 та вісфатину (в 1,2 рази, p<0,05) у щурів з ДІО. За умов ДІО інгібування системи H₂S/CSE в міокарді та аорті за дії ППГ асоціювалось зі зниженням протизапальної, антиапоптичної, антиоксидантної дії (в 1,2-1,4 рази, p<0,05) кальцитріолу. Введення NaHS посилювало кардіо- та ендотеліопротекторну дію кальцитріолу через коригуючий вплив на медіатори апоптозу, запалення, дисфункції ендотелію та атерогенезу (TNFα, каспазу-3, Hsp70, Hsp60, ендотелін-1, вісфатин), процеси вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів. Таким чином, результати дисертаційного дослідження експериментально обґрунтовують нові підходи до підвищення кардіо- та вазопротекторних ефектів вітаміну D шляхом його сумісного застосування з донорами H₂S, що свідчить про практичне значення даної роботи і перспективність подальших досліджень.

Ключові слова: вітамін D, кальцитріол, гідроген сульфід, метаболізм, серце, судини, серцево-судинна система, кардіопротекція, ожиріння, запалення, апоптоз, адипокіни, модулятори, щурі.

ANNOTATION

Ostreniuk Roman. The role of vitamin D in regulating of hydrogen sulfide metabolism in cardiovascular system of rats and the mechanisms of H₂S-dependent cardioprotection (experimental study). Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in 09 «Biology» in speciality 091 «Biology and biochemistry». – National Pirogov Memorial Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2026.

Considered and solved in the dissertation scientific task consisted in establishing the role of vitamin D in regulating hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in cardiovascular system of rats and the mechanisms of H₂S-dependent cardioprotection in experimental diet-induced obesity.

The experiments were carried on 235 laboratory white male Wistar rats in accordance with Directive of the European Parliament and of the Council (Directive 2010/63/EU), the other international and national regulatory legal acts, certified by the Bioethics Committee of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya (protocol № 9 dated November 1, 2018, № 4 dated March 18, 2026). To accomplish the objectives of the scientific research, three series of experiments were conducted: determining the effect of different doses of the active form of vitamin D — calcitriol (1,25(OH)₂D₃) on H₂S metabolism markers and CSE gene expression in cardiovascular system of rats; assessing the impact of calcitriol on inflammatory and apoptosis mediators, oxidative stress markers in the myocardium, serum markers of endothelial dysfunction, aorta morphological changes under conditions of H₂S/cystathionine-γ-lyase (CSE) system modulation; investigating the effects of

H₂S/CSE system modulators on the cardioprotective effects of calcitriol in case of diet-induced obesity (DIO), predetermined by a high-calorie, high-fat diet.

The results of the study originally revealed the specific effects of calcitriol on various pathways of sulfur metabolism in cardiovascular system of rats, depending on the dose and duration of its administration. It was shown that 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 0,1 µg/kg applied for 28 days caused an increase in H₂S level in myocardium and aorta of intact mature rats (by 52,8 and 37,1%, p<0,01), an increase (1,3–1,4 times, p<0,05) in the activity of H₂S-synthesizing enzymes — cystathionine-γ-lyase (CSE), cysteine aminotransferase/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (CAT/3-MST), thiosulfate sulfurtransferase (TST), but without considerable changes in the activity of mitochondrial enzymes of H₂S metabolism, such as thioredoxin reductase (TrxR) and sulfite oxidase (SO). The administration of 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 1 µg/kg had a stimulating effect on sulfur metabolism in myocardium and aorta of rats during the first 14 days. However, it led to a decrease in the activity of H₂S-synthesizing enzymes over time, causing an imbalance in the CSE and CAT/3-MST pathways (with a reduction of CSE/CAT ratio by 1,4–1,5 times, p < 0.05); a decrease (by 1,2–1,3 times, p < 0.05) in the activity of mitochondrial enzymes (TST, TrxR, SO); and the development of H₂S deficiency.

It was established that calcitriol, at both physiological and high doses, induces different changes in the expression of CSE gene cardiovascular system of rats. The administration of 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 0,1 µg/kg led to an increase in the relative mRNA level of CSE/Actb in myocardium and aorta by 34,2% and 38,8%, (p < 0,01) by day 28. In contrast, the administration of 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 1 µg/kg suppressed CSE gene expression: the relative mRNA level of CSE/Actb in the myocardium and aorta was significantly lower (by 37,2% and 32,6%, p < 0,01) compared to the control group. The changes in CSE gene expression under the influence of different doses of calcitriol were consistent with changes in the desulfurase activity of this enzyme. Thus, calcitriol is involved in the regulation of H₂S biosynthesis at the level of CSE gene expression in cardiovascular system of

rats, realizing a stimulating effect at a physiological dose and an inhibitory effect at a high dose.

It has been shown that H₂S/CSE system is integrated into the mechanisms of the biological action of vitamin D in active form, and its modulators significantly modify cardiovascular effects of calcitriol. Administration of 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 0,1 µg/kg for 4 weeks did not cause any significant changes in myocardium of intact rats. However, at a dose of 1 µg/kg, it led to an increase in proinflammatory and proapoptotic mediators levels — TNFα and caspase-3 (by 28,3% and 25,3%, $p < 0,01$), a decrease in antiapoptotic cytoprotective heat shock protein Hsp70 level (by 17,2%, $p < 0,05$); a reduction in Hsp70/Hsp60 index (by 23,2%, $p < 0,01$); an increase in oxidative stress markers — MDA and protein carbonyl groups (by 48,2% and 50%, $p < 0,001$). Modulators of H₂S/CSE system significantly modified the myocardial effects of calcitriol: CSE inhibitor propargylglycine (PPG) amplified the proinflammatory, proapoptotic, prooxidant effects of a high dose of 1,25(OH)₂D₃ (by 1,5–2,2 times, $p < 0,001$), while H₂S donor NaHS, on the contrary, reduced these effects. 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 0,1 µg/kg reduced the cardiotoxic effects of PPG and, when combined with NaHS, promoted a moderate increase in Hsp70 level (by 12,5%, $p < 0,05$) and a decrease in caspase-3 level (by 19,1%, $p < 0,05$). Strong inverse correlations were observed between H₂S and TNFα and caspase-3 levels in myocardium ($r_{sp} = -0,61; -0,76, p < 0,001$), as well as a direct correlation with Hsp70 level ($r_{sp} = 0,60, p < 0,001$).

Administration of 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 0,1 µg/kg for 28 days did not cause significant changes in aorta of intact rats. However, at a dose of 1 µg/kg, it led to an increase in serum endothelin-1 level (by 126,3%, $p < 0,001$), microscopic signs of vascular endothelial damage, thickening of the internal elastic membrane and changes in smooth muscle cells. PPG enhanced vasotoxic effect of the high dose of 1,25(OH)₂D₃ due to the significant reduction of aorta H₂S level (by 67,7%, $p < 0,001$), stimulated an increase of endothelin-1 level (by 174,6%, $p < 0,001$), exacerbated morphological changes of vascular wall. In contrast, NaHS administration exerted a vasoprotective effect.

The effects of calcitriol on the H₂S/CSE system in cardiovascular system of rats with DIO under the conditions of PPG and NaHS administration were established. In rats with DIO, decreased H₂S level (by 1,3 times, $p < 0,001$) and reduced CSE activity (by 1,2–1,4 times, $p < 0,05$) were recorded in myocardium and aorta. Administration of 1,25(OH)₂D₃ at a dose of 0,1 µg/kg significantly increased H₂S level and CSE activity (by 1,22–1,48 times, $p < 0,05$) in myocardium and aorta of rats with DIO. PPG administration nullified the effect of 1,25(OH)₂D₃ on CSE activity and exacerbated the H₂S deficiency in myocardium and aorta of rats with DIO. In contrast, NaHS enhanced the stimulatory effect of 1,25(OH)₂D₃ on H₂S/CSE system and prevented the development of H₂S deficiency in myocardium and aorta of rats with DIO.

For the first time, the involvement of H₂S/CSE system into the regulatory effects of calcitriol on inflammation, apoptosis, and ER stress mediators in myocardium (caspase-3, TNF α , Hsp70, Hsp60), mediators of endothelial dysfunction and atherogenesis (endothelin-1 and visfatin) in blood serum of rats with DIO, has been demonstrated. In rats with DIO, increased levels of caspase-3, TNF α , and Hsp60 (by 1,34–2,1 times, $p < 0,01$), decreased Hsp70 level (by 1,2 times, $p < 0,05$), elevated levels of MDA and carbonyl groups (by 1,6–1,7 times, $p < 0,01$) in myocardium, and increased serum levels of endothelin-1 and visfatin (by 1,96–2.1 times, $p < 0,001$) were observed. Administration of 1,25(OH)₂D₃ led to a reduction in caspase-3, TNF α , and Hsp60 levels (by 1,2–1,3 times, $p < 0,05$), an increase in Hsp70 level (by 1,24 times, $p < 0,05$), reduced oxidative stress markers in myocardium, and decreased serum levels of endothelin-1 and visfatin (by 1,2 times, $p < 0,05$) in rats with DIO. Under DIO conditions, inhibition of H₂S/CSE system in myocardium and aorta by PPG was associated with a reduction in the anti-inflammatory, antiapoptotic and antioxidant effects of calcitriol (by 1,2–1,4 times, $p < 0,05$). NaHS administration enhanced endothelial and cardioprotective effects of calcitriol by modulating the activity of apoptosis, inflammation, endothelial dysfunction, atherogenesis mediators (TNF α , caspase-3, Hsp70, Hsp60, endothelin-1, visfatin) and reducing free radical lipid and protein oxidation processes. Thus, the

results of the dissertation research experimentally substantiate new approaches to enhancing of the cardio- and vasoprotective effects of vitamin D through its combined use with H₂S donors, indicating the practical significance of this study and the prospects for further research.

Key words: vitamin D, calcitriol, hydrogen sulfide, metabolism, heart, blood vessels, cardiovascular system, cardioprotection, obesity, inflammation, apoptosis, adipokines, modulators, rats.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В. (2022). Рівень гідроген сульфїду та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гама-ліаза. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 26(4), 550-556.
2. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів. *Медична та клінічна хімія*, 25(3), 5–12.
3. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В. (2023). Вплив кальцитріолу на показники апоптозу, запалення та оксидативного стресу в міокарді щурів за умов модуляції системи гідроген сульфїд / цистатіонін-гама-ліаза. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 27(4), 570–575.
4. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В. (2023). Роль системи H₂S / цистатіонін-γ-ліаза в механізмах кардіопротекторної дії вітаміну D за дієт-індукованого ожиріння. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 98(4), 35–41.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

5. Патент на корисну модель № 143133, Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01) A61K 31/38 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01). Спосіб корекції обміну гідрогену сульфїду за алїментарного ожиріння в експерименті / Заїчко Н.В., Блажченко В.В., Бобецька О.П., Штатько О.І., Остренюк Р.С. заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова. – № u 202000958; заявл. 14.02.2020; опубл. 10.07.2020, Бюл. № 13.
6. Методика моделювання кардіоміопатії за експериментального ожиріння: свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір №122462 від 28.12.2023 / Бобецька О.П., Остренюк Р.С., Заїчко Н.В., Самборська І.А., Блажченко В.В.
7. Методика підвищення кардіопротекторного ефекту вітаміну Д при порушеннях сульфїдного обміну за алїментарного ожиріння: свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 133891 від 27.02.2025 / Остренюк Р.С., Заїчко Н.В., Бобецька О.П., Блажченко В.В.
8. Заїчко, Н., Остренюк, Р., Бобецька, О., Блажченко, В. (2025). Вплив кальцитріолу на соматометричні параметри та рівень вісфатину в сироватці крові щурів з дієтиндукованим ожирінням за умов модуляції сульфїдного обміну. *Перспективи та інновації науки. Серія «Медицина»*, № 10(56), 2533-2542.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

9. Остренюк Р.С., Блажченко В.В. Вплив високожирової дієти на вміст гідроген сульфїду в міокарді та нирках щурів. Матеріали наукової конференції «Перший крок в науку – 2017», м. Вінниця, 26-28 квітня 2017 р. С. 220-221.
10. Заїчко Н.В., Блажченко В.В., Остренюк Р.С. Аналіз впливу високожирової дієти на кінетичні параметри синтезу гідроген сульфїду в органах щурів. Матеріали LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ)», м. Тернопіль, 17 червня 2017 р. С. 288-290.

11. Blazhchenko V.V., Ostrenyuk R.S., Zaichko N.V. The activity of enzymes of transsulfuration in kidneys and myocardium of rats with experimental obesity. Abstract VIII Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, Lublin, Poland, 18-20 September 2017. P. 52.
12. Остреньук Р.С. Стан системи гідроген сульфід / цистатіонін-гама-ліаза в міокарді щурів за умов дефіциту вітаміну D3. Матеріали XVI міжнародної студентської наукової конференції «Перший крок в науку – 2019», м. Вінниця, 18-19 квітня 2019 р. С. 455-456.
13. Zaichko N.V., Kachula S.O., Ostrenyuk R.S. Influence of calcitriol on desulfuration processes in myocardium of rats. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. С. 230.
14. Заїчко Н.В., Штатько О.І., Остреньук Р.С. Вплив кальцитріолу на стан системи гідроген сульфиду в міокарді щурів за гіпергомоцистеїнемії. Матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції за участі міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини», м. Вінниця, 7-8 листопада 2019 р. С. 159-160.
15. Zaichko N.V., Palamarchuk I.V., Blazhchenko V.V., Ostrenyuk R.S., Bobetska O.P. Age related changes in hydrogen sulfide metabolism in rats organs: connection with mediators of angiogenesis. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. С. 187–188.
16. Ostrenyuk R., Samborska I., Zaichko N. Influence of calcitriol on the morphological state of the aorta of rats under conditions of inhibition on the hydrogen sulfide / cystathionine-gamma-lyase system. Materials of the 6th international scientific conference «Current problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology», Dnipro, 6-7 october 2022. P. 148-149.
17. Заїчко Н.В., Бобецька О.П., Остреньук Р.С., Блажченко В.В. Вплив модуляторів обміну гідроген сульфиду на продукцію медіаторів ліпогенезу в серцево-судинній системі щурів за дієт-індукованого ожиріння. Збірник наукових праць XIX наукової конференції, присвяченої 150-річчю Наукового

товариства ім. Шевченка «Львівські хімічні читання-2023», м. Львів, 29-31 травня 2023 р. С. 19.

18. Остренюк Р.С., Заїчко Н.В. Роль гідроген сульфід у механізмах ендотеліопротекторної дії вітаміну D за експериментального ожиріння. Матеріали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції за участі міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Клінічна фармакологія сьогодні: шляхи максимальної допомоги лікарській спеціальності», м. Вінниця, 9-10 листопада 2023 р. С. 103-104.

19. Остренюк Р.С., Заїчко Н.В. Вплив кальцитріолу на біохімічні зміни в аорті щурів в умовах інгібування системи гідроген сульфід / цистатіонін-гама-ліаза. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Бабенківські читання», м. Івано-Франківськ, 26-27 жовтня 2023 р. С. 65.

20. Ostrenyuk R., Bobetska O., Zaichko N. The influence of calcitriol on the level of visfatin in the heart of rats with experimental obesity. Матеріали VII Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології», м. Дніпро, 3-4 жовтня 2024 р. С. 145-146.

21. Остренюк Р.С., Заїчко Н.В., Блажченко В.В. Біохімічні зміни в серці щурів за дії кальцитріолу та модуляції сульфідного обміну. Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», м. Тернопіль, 23-25 жовтня 2024 р. С. 43.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1 РОЛЬ ВІТАМІНУ D В РЕГУЛЯЦІЇ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ТА КАРДІОПРОТЕКЦІЇ (огляд літератури)	24
1.1 Сучасні аспекти метаболізму та основні молекулярні ефекти вітаміну D.....	24
1.2 Біохімічні механізми реалізації кардіопротекторної дії вітаміну D.....	31
1.3 Особливості обміну гідроген сульфїду в серцево-судинній системі та механізми H ₂ S-залежної кардіопротекції.....	37
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	48
2.1 Експериментальні тварини, моделі, дизайн дослідження	48
2.2 Методи одержання біологічного матеріалу	55
2.3 Методи біохімічних та імуноензимних досліджень.....	55
2.4 Дослідження експресії гена цистатіонін-γ-ліази (<i>CSE</i>).....	60
2.5 Морфологічні дослідження.....	61
2.6 Статистичні методи обробки експериментальних даних	62
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ КАЛЬЦИТРІОЛУ НА МЕТАБОЛІЗМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В SERЦЕBO-CYДИHНІЙ СИСТЕМІ ЩYРІВ	64
3.1 Вплив кальцитріолу на рівень H ₂ S в серцево-судинній системі щурів.....	65
3.2 Вплив кальцитріолу на ензиматичне утворення H ₂ S в шляхах десульфуровання L-цистеїну та експресію гена <i>CSE</i> в міокарді та аорті щурів.....	68
3.3 Вплив кальцитріолу на активність ензимів мітохондріальних шляхів метаболізму H ₂ S в міокарді та аорті щурів	73

РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ КАЛЬЦИТРИОЛУ НА МЕДІАТОРИ АПОПТОЗУ, ЗАПАЛЕННЯ, МАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В МІОКАРДІ, МІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ В АОРТІ ЩУРІВ В УМОВАХ МОДУЛЯЦІЇ СИСТЕМИ H ₂ S/ CSE	78
4.1 Вплив кальцитріолу на рівень гідроген сульфїду в міокарді та аорті щурів в умовах модуляції стану системи H ₂ S/ CSE	79
4.2 Вплив кальцитріолу на медіатори апоптозу, запалення та маркери оксидативного стресу в міокарді щурів за умов модуляції системи H ₂ S / CSE	82
4.3 Вплив кальцитріолу на сироватковий рівень ендотелїну-1 та морфологічний стан грудної аорти щурів в умовах модуляції системи H ₂ S/ CSE.....	92
РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ КАЛЬЦИТРИОЛУ НА МЕДІАТОРИ УШКОДЖЕННЯ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ ЗА ДІЄТ-ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ В УМОВАХ МОДУЛЯЦІЇ СИСТЕМИ H ₂ S / CSE.....	101
5.1 Вплив кальцитріолу на соматометричні параметри щурів з дієтіндукованим ожирінням в умовах модуляції системи H ₂ S/ CSE.....	102
5.2 Вплив кальцитріолу на стан системи H ₂ S/ CSE у щурів з дієтіндукованим ожирінням за дії модуляторів сульфїдного обміну.....	106
5.3 Вплив кальцитріолу на медіатори запалення, апоптозу, маркери оксидативного стресу, ендотелїальної дисфункції у щурів з дієтіндукованим ожирінням в умовах модуляції системи H ₂ S/ CSE.	108
РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.	120
ВИСНОВКИ.....	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	136
ДОДАТОК А.....	182
ДОДАТОК Б	190

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВКД	- висококалорійна дієта
в/оч	- внутрішньоочеревинно
в/шл	- внутрішньошлунково
ВНМУ	- Вінницький національний медичний університет
ДІ	- довірчий інтервал
ДІО	- дієтіндуковане ожиріння
ІМТ	- індекс маси тіла
ЕПР	- ендоплазматичний ретикулум
ПАЛФ	- піридоксальфосфат
ППГ	- пропаргілгліцин
CSE	- цистатіонін- γ -ліаза
CAT	- цистеїнамінотрансфераза
3-MST	- 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза
TST	- тіосульфат(тіол)сульфуртрансфераза
H ₂ S	- гідроген сульфід
NaHS	- натрій гідрогенсульфід
HSP	- протеїн теплового шоку
1,25 (OH) ₂ D ₃	- кальцитріол
HSP70/ HSP60	- коефіцієнт дисбалансу протеїнів теплового шоку
TNF α	- фактор некрозу пухлини альфа
TrxR	- тіоредоксинредуктаза
SO	- сульфітоксидаза

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Вітамін D відіграє важливу роль в контролі функціонального та метаболічного стану серцево-судинної системи, включаючи регуляцію артеріального тиску, ендотеліальну функцію, процеси ремоделювання та гіпертрофії міокарду [31; 142]. Біологічною активністю володіє продукт гідроксилювання вітаміну D – кальцитріол ($(\text{OH})_2\text{D}_3$), який взаємодіє зі специфічними VDR-рецепторами клітин-мішеней і регулює експресію чисельних вітамін D-залежних генів, що контролюють синтез факторів транскрипції, ростових факторів, прозапальних і протизапальних цитокінів, антиоксидантних протеїнів, вазоактивних молекул тощо [65]. Встановлено, що VDR-рецептори експресуються у кардіоміоцитах, фібробластах, ендотелії судин [64; 142; 31].

Серед чинників, які визначають адаптивний потенціал та гомеостаз серця та судин важливу роль відіграє гідроген сульфід (H_2S) [194; 160; 135], ензимний синтез якого забезпечують цистатіонін- γ -ліаза (CSE), цистеїнамінотрансфераза разом з 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза (шлях CAT/3-MST) [160; 135]. Також потенційним джерелом ендогенного H_2S може слугувати відновлення тіосульфат-аніону за участі тіосульфатсульфуртрансфераз (TST) [160; 135; 152; 189]. Важливу роль в регуляції рівня ендогенного H_2S відіграють мітохондріальні ензими, які забезпечують депонування та утилізацію H_2S [160; 135]. Існують експериментальні докази, що вітамін D дотичний до регуляції сульфідного обміну та рівня ендогенного H_2S [258; 163; 116]. Зокрема, Wiliński B. et al. (2012) вперше констатували здатність вітаміну D_3 підвищувати концентрацію H_2S в міокарді здорових мишей [258]. Manna P. et al. (2012) показали, що кальцитріол може стимулювати експресію CSE в культурі клітин *in vitro* [163].

Доведено, що дефіцит вітаміну D асоціюється з підвищеним ризиком атеросклерозу, артеріальної гіпертензії, серцевої недостатності, аритмій, цукрового діабету, ожиріння [249; 73]. Зниження ендогенної продукції H_2S

також інтегровано в патогенез кардіоваскулярної патології та інших «хвороб цивілізації» [259], що асоціюються з дефіцитом вітаміну D. Не виключено, що порушення обміну H_2S можуть модифікувати біологічні ефекти вітаміну D, однак детальних досліджень в цьому напрямку не проводилось і роль вітаміну D в регуляції різних ланок метаболізму H_2S в серцево-судинній системі потребує подальших досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у рамках планових НДР Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Роль екзогенних та ендогенних сірковмісних сполук в механізмах ураження внутрішніх органів та цитопротекції за різних патологічних станів» (№ ДР 0119U001142, 2018-2023), «Біохімічні механізми індукції мультиморбідних станів та нові напрямки метаболічної корекції» (№ ДР 0124U003381, 2024-2028). Автор є співвиконавцем вказаних тем.

Мета дослідження

Встановити роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів та механізмах H_2S -залежної кардіопротекції за дієтіндукованого ожиріння в експерименті.

Завдання дослідження:

1. Дослідити вплив активної форми вітаміну D - кальцитріолу ($1,25(OH)_2D_3$) у дозах 0,1 та 1 мкг/кг на показники обміну гідроген сульфїду та експресію гена цистатіонін- γ -ліази (*CSE*) в серці та грудній аорті здорових статевозрілих щурів.

2. Дослідити вплив кальцитріолу на рівні медіаторів запалення, апоптозу, стресу ендоплазматичного ретикулума (фактору некрозу пухлини альфа, каспази-3, протеїнів теплового шоку HSP60, HSP70), маркери оксидативного стресу в серці щурів в умовах модуляції системи H_2S / цистатіонін- γ -ліаза (*CSE*).

3. Вивчити вплив кальцитріолу на сироватковий рівень ендотеліну-1 та морфологічний стан грудної аорти щурів в умовах модуляції системи H_2S / CSE.

4. Дослідити вплив кальцитріолу та його поєднання з пропаргілгліцином та натрій гідрогенсульфідом на стан системи H_2S / CSE в серці та аорті щурів з дієтіндукованим ожирінням.

5. Оцінити вплив модуляторів системи H_2S / CSE на кардіопротекторні ефекти кальцитріолу у щурів з дієтіндукованим ожирінням.

Об'єкт дослідження: роль вітаміну D в регуляції метаболізму H_2S в серцево-судинній системі та метаболічній кардіопротекції.

Предмет дослідження: показники обміну H_2S (активність ензимів синтезу та утилізації H_2S , експресія гена CSE); медіатори апоптозу, запалення, ЕПР-стресу, ендотеліальної дисфункції (каспаза-3, $TNF\alpha$, HSP60, HSP70, ендотелін-1, вісфатин); маркери оксидативного стресу; морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за дії кальцитріолу; кардіопротекторна ефективність $1,25 (OH)_2D_3$ за модуляції системи H_2S / цистатіонін- γ -ліаза.

Методи дослідження: біохімічні (спектрофотометричні дослідження рівня H_2S , активності ензимів обміну H_2S , маркерів оксидативного стресу), імуноензимні (рівні каспази-3, $TNF\alpha$, HSP60, HSP70, ендотеліну-1, вісфатину), молекулярно-генетичні (рівень експресії гена CSE), соматометричні, морфологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Поглиблені наукові уявлення про участь вітаміну D в регуляції метаболізму H_2S в серцево-судинній системі та значення системи H_2S / CSE в механізмах реалізації його кардіопротекторної дії в експериментальних умовах.

Вперше встановлено особливості впливу кальцитріолу ($1,25 (OH)_2D_3$) у різних концентраціях на різні шляхи сульфідного обміну в міокарді та аорті здорових щурів. Показано, що кальцитріол у високій дозі стимулює синтез H_2S за участі CSE, CAT/3-MST, TST лише при нетривалому застосуванні, але надалі пригнічує активність цитозольних та мітохондріальних ензимів

сульфідного обміну, інгібує експресію гена CSE і викликає формування дефіциту H_2S в серцево-судинній системі. Кальцитріол у фізіологічній концентрації викликає помірну активацію H_2S -синтезуючих ензимів (CSE, CAT/3-MST, TST), підвищення експресії CSE та збільшення рівня ендogenous H_2S в міокарді та аорті щурів у різні терміни досліду.

Встановлено, що система H_2S / CSE інтегрована в механізми біологічної дії кальцитріолу, а її модулятори суттєво модифікують серцево-судинні ефекти кальцитріолу. Вперше засвідчено, що за інгібування CSE-залежного синтезу H_2S зменшується кардіопротекторна ефективність фізіологічної дози кальцитріолу і посилюється кардіо- та вазотоксична дія високої дози цього гормону. Вперше доведено дотичність системи H_2S / CSE до механізмів регуляторного впливу кальцитріолу на рівні медіаторів запалення, апоптозу, ЕПР-стресу, дисфункції ендотелію (каспази-3, $TNF\alpha$, Hsp70, Hsp60, ендотеліну-1) в серцево-судинній системі у фізіологічних умовах та за дієтіндукованого ожиріння. Показано, що за ожиріння кальцитріол у поєднанні з донором H_2S більш ефективно коригує рівні медіаторів ушкодження серця та судин, а також зменшує рівень прозапального проатерогенного адипокіну - вісфатину, ніж при ізольованому застосуванні. У той же час, інгібування синтезу ендogenous H_2S є чинником, що погіршує кардіо- та ендотеліопротекторний ефект кальцитріолу за ожиріння.

Практичне значення одержаних результатів. Доповнено теоретичні уявлення про біохімічні механізми реалізації регуляторної функції $1,25(OH)_2D_3$ в серцево-судинній системі, які опосередковуються через систему H_2S / CSE. Результати дослідження експериментально обґрунтовують нові підходи до підвищення кардіопротекторного ефекту кальцитріолу при ожирінні шляхом сумісного застосування з донорами H_2S . Для оцінки виразності дисбалансу в шляхах метаболізму H_2S в серцево-судинній системі та ефективності коректорів сульфідного обміну за різних патологічних станів доцільно розраховувати коефіцієнт CSE /CAT.

Практичне значення результатів дослідження підтверджується 1 патентом України на корисну модель (№143133) та авторським свідоцтвом на твір (№122462).

Результати дослідження використовуються в науковій роботі та навчальному процесі кафедр біохімії ім. професора О.О. Пентюка, фармакології, патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова; кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри біохімії навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету, кафедри біологічної та біоорганічної хімії Полтавського державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є завершеною науковою працею, що виконана автором особисто відповідно до програми експериментальних досліджень. Дисертантом особисто проведено пошук та аналіз фахової наукової літератури, визначено напрямки та методологію експериментального дослідження, розроблено його дизайн, сформульовані основні наукові положення та оформлені усі розділи дисертації. Ключові положення роботи (мета, завдання, висновки) обговорені з науковим керівником д.мед.н., професором Заїчко Н.В. і сформульовані автором особисто. Дисертантом самостійно проведені усі етапи експериментів на тваринах, виконано біохімічні дослідження та імуноензимний аналіз (на базі НДКДЛ ВНМУ ім. М.І. Пирогова), особисто написані та оформлені наукові публікації. Дослідження експресії гена *CSE* проведено на базі ННКДЛ ПЛР ВНМУ ім. М.І. Пирогова спільно із завідувачем лабораторії Людкевич Г.П. Моделювання експериментального ожиріння проведено спільно із співробітниками кафедри біохімії ім. професора О.О. Пентюка, що відображено в окремих наукових публікаціях. У працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий

доробок (результати власних досліджень, участь в аналізі та узагальненні отриманих даних, оформленні праці до друку). Автор не запозичував науковий доробок співавторів публікацій.

Апробація результатів дослідження. Основні положення роботи оприлюднені на: XIV, XV, XVI, XVII міжнародних науково-практичних конференціях студентів і молодих вчених «Перший крок в науку» (Вінниця, 2017, 2018, 2019, 2020); LX науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ)» (Тернопіль, 2017); VIII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry (Lublin, 2017); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019); науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Бабенківські читання» (Івано-Франківськ, 2019, 2023); X Всеукраїнській науково-практичній конференції за участі міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапія та профілактиці захворювань з позиції доказової медицини» (Вінниця, 2019); XII Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Клінічна фармакологія сьогодення: шляхи максимальної допомоги лікарській спеціальності» (Вінниця, 2023); VI та VII Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (Дніпро, 2022, 2024); XIX науковій конференції, присвяченій 150-річчю Наукового товариства ім. Шевченка, «Львівські хімічні читання-2023» (Львів, 2023); XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2024); Науковій конференції молодих вчених - 2025 (Вінниця, 2025); засіданнях кафедри біохімії ім. професора О. О. Пентюка Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (2017-2025).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 21 наукова праця: 5 статей у наукових фахових виданнях МОН України (категорія Б), 13 тез - в

матеріалах конгресів та конференцій, 1 патент України, 2 авторських свідоцтва на твір.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 197 сторінках друкованого тексту і складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних літературних джерел, що включає 294 найменування (з них 267 латиницею), додатків. Робота ілюстрована 13 таблицями та 37 рисунками.

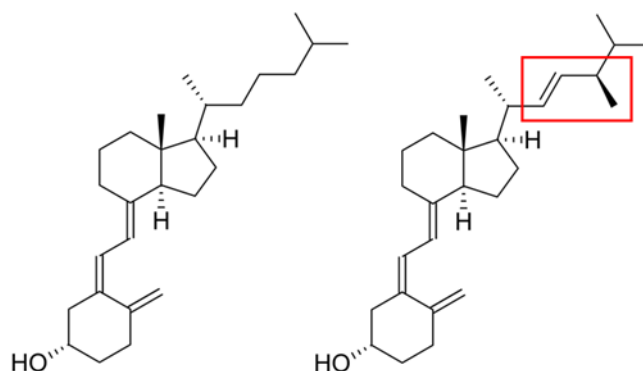
РОЗДІЛ 1

РОЛЬ ВІТАМІНУ D В РЕГУЛЯЦІЇ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ТА КАРДІОПРОТЕКЦІЇ (огляд літератури)

1.1. Сучасні аспекти метаболізму та основні молекулярні ефекти вітаміну D

Зростання уваги наукової спільноти до глобальної проблеми дефіциту вітаміну D у світі стало поштовхом до поглибленого вивчення особливостей його метаболізму та біологічного значення на молекулярному рівні [33; 244]. За сучасними даними, біологічні функції вітаміну D значно виходять за межі регуляції кальцій-фосфорного обміну [32; 198]. Численні дослідження свідчать про взаємозв'язок між ступенем забезпеченості організму вітаміном D та метаболічними порушеннями, демонструючи вплив на процеси диференціації та проліферації клітин, апоптоз, регуляцію імунної системи тощо [198; 244].

Особливості метаболізму вітаміну D. Вітамін D належить до групи жиророзчинних секостероїдів, що являються похідними холестеролу та мають



Холекальциферол (D₃)

Ергокальциферол (D₂)

розірваний зв'язок у одному із стероїдних кілець.

Основними представниками вітаміну D являються вітамін D₃

(холекальциферол) та D₂ (ергокальциферол) [43].

Обидві форми подібні за будовою та відрізняються

наявністю додаткового подвійного зв'язку між 22 та 23 атомами карбону та метильної групи на 24 атомі карбону у структурі ергокальциферолу [57].

Вітамін D₂ надходить в організм лише екзогенно у складі продуктів харчування [96], тоді як основним джерелом вітаміну D₃ для організму людини являється процес його синтезу у шкірі з 7-дегідрохолестеролу під дією ультрафіолетового випромінювання (довжина хвилі від 290 до 315 нм) [261]. Поглинання енергії УФ-випромінювання призводить до розриву зв'язку між 9 та 10 атомами карбону з утворенням нестабільного ізомеру – превітаміну D₃. Такий розрив зв'язку призводить до спонтанного обертання навколо зв'язку між 5 та 6 атомами карбону з утворенням більш стабільної ізомерної форми – вітаміну D₃ [47]. Превітамін D₃, перебуваючи у s-цис, s-цис конформації, за рахунок гідрофобних та гідрофільних зв'язків здатен затримуватися всередині ліпідного шару мембрани. В свою чергу, процес ізомеризації призводить до послаблення такої взаємодії та сприяє виходу утвореного вітаміну D₃ в інтерстиціальну рідину. Далі, завдяки наявності вітамін D-зв'язуючого білку у капілярах дерми, створюється градієнт концентрації вільного вітаміну D, що призводить до його виходу з інтерстиціальної рідини в кровообіг [107]. Так, безпосереднім субстратом для синтезу вітаміну D₃ являється 7-дегідрохолестерол, що є метаболітом шляху Кандуч-Рассела (Kandutsch/Russel pathway) - альтернативного шляху синтезу холестеролу відносно шляху Блоха (Bloch pathway) [218]. Висока активність шляху Кандуч-Рассела у шкірі забезпечує утворення достатньої кількості 7-дегідрохолестеролу для синтезу вітаміну D₃ [218]. Синтез вітаміну D₃ під дією ультрафіолетового випромінювання являється неферментативним процесом. В свою чергу, утворення холестеролу з 7-дегідрохолестеролу відбувається під дією 7-дегідрохолестерол редуктази (DHCR7). Так, зміна активності DHCR7 буде впливати на кількість доступного субстрату синтезу вітаміну D - 7-дегідрохолестеролу, та може розглядатись як перша ланка регуляції біосинтезу рівня вітаміну D [97]. Поглинання енергії ультрафіолетового випромінювання та використання її на перебудову хімічних зв'язків у процесі утворення превітаміну D₃ також являється механізмом захисту шкіри від негативного впливу УФ. Тому, для запобігання утворення надмірної кількості

вітаміну D₃, довготривала дія ультрафіолетового випромінювання призводить до утворення люмістеролу 3 (L3) та тахістеролу (Т3) з превітаміну D₃ [229]. Утворені люмістерол та тахістерол можуть піддаватись гідроксилюванню з утворенням похідних з високою біологічною активністю, що здатні, зокрема, підвищувати експресію рецептору вітаміну D (VDR) [59; 230].

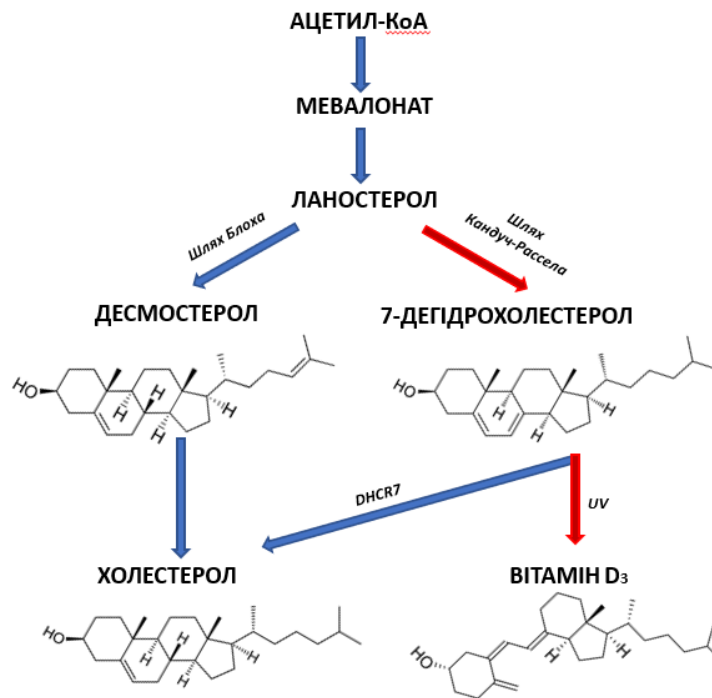


Рис. 1.1. Схема біосинтезу вітаміну D₃ [207].

Ергокальциферол та холекальциферол являються біологічно неактивними формами. Для реалізації біологічних властивостей вітамін D потребує подальшої активації, що відбувається у печінці та нирках за рахунок двох стадій гідроксилювання [58]. Перебуваючи у комплексі з вітамін D-зв'язуючим білком, вітамін D поглинається з потоку крові клітинами печінки та за участі мікосомального цитохрому P450 CYP2R1 та мітохондріального CYP27A1 гідроксилюється по 25-тому атому карбону з утворенням найбільш поширеного метаболіту вітаміну D – кальцидіолу або 25(OH)D [33]. Маючи період напіввиведення від 2 до 3 неділь, 25(OH)D являється основною циркулюючою формою в плазмі крові і, відповідно, головним маркером оцінки ступеня забезпеченості організму вітаміном D [208]. Кальцидіол в плазмі крові переважно знаходиться у зв'язаній з протеїнами формі - від 85 до

90 % 25(OH)D зв'язано з вітаміном D зв'язуючим білком (VDBP), від 10 до 15 % - з альбуміном і лише близько 1 % перебуває у вільній формі [45]. 25(OH)D транспортується у нирки саме за допомогою VDBP, що є транспортуючим протеїном для всіх інтермедіатів вітаміну D, при цьому найбільшу спорідненість проявляє саме до 25(OH)D (у 20 разів вище, ніж до 1,25(OH)₂D) [82]. Проникненню 25(OH)D в епітеліальні каналці нирок сприяє мегалін - трансмембранний білок, з родини ліпопротеїнів низької щільності, що виконує роль рецептора для VDBP [65]. Далі, в проксимальних каналцях нирок за участі 1 α -гідроксилази (CYP27B1) проходить приєднання гідроксильної групи до першого атому карбону з утворенням кальцитріолу (1,25(OH)₂D) – активної гормональної форми вітаміну D [260]. Експресія 1 α -гідроксилази виявляється також в інших клітинах, таких як моноцити, макрофаги, остеобласти, кератиноцити [203]. Окрім гідроксилювання за участі 1 α -гідроксилази, в нирках можливий інший варіант гідроксилювання – по 24 атому карбону, за участі CYP24A1 з утворенням 24,25(OH)₂D. Важливою особливістю CYP24A1, що надає йому регулюючу функцію у метаболізмі вітаміну D, є можливість гідроксилювати 1,25(OH)₂D також, з утворенням 1,24,25(OH)₃D [71]. Процес регуляції реалізується як гідроксилюванням 1,25(OH)₂D, безпосередньо зменшуючи його концентрацію, так і гідроксилюванням 25(OH)D, знижуючи його кількість, доступну для утворення 1,25(OH)₂D. Фактором, що індукує експресію 1 α -гідроксилази (CYP27B1), виступає паратгормон (ПТГ) [48]. В свою чергу, утворений 1,25(OH)₂D являється інгібітором секреції ПТГ. Експресія CYP24A1 регулюється безпосередньо 1,25(OH)₂D, зростаючи у відповідь на збільшенні концентрації та інгібуючись при гіпокальціємії та низькому рівні ПТГ [174]. CYP27B, що експресується поза нирками (епітеліальна тканина, плацента, кістки, залози внутрішньої секреції, мозок, печінка, ендотелій), не контролюється ПТГ та рівнем кальцію у плазмі крові [144].

Молекулярні механізми реалізації біологічної дії вітаміну D. Біологічні властивості вітаміну D реалізуються двома основними шляхами – геномним та

негеномним. [144]. Геномний шлях полягає у взаємодії активної форми вітаміну D – $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ з відповідним рецептором вітаміну D (VDR). VDR є представником групи стероїдних рецепторів, утворений одним амінокислотним ланцюгом, з масою 50 кДа. При взаємодії з $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, VDR зазнає конформаційних змін, що дає змогу полегшити з'єднання з ретиноїдним X-рецептором (RXR) для реалізації впливу на експресію генів-мішеней [201]. Гетеродимер $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ – VDR – RXR має високу афінність до специфічних цільових ділянок ДНК – VDRE, з'єднуючись з якими транскрипція активується або інгібується [91; 248]. Останні дослідження показали, що не тільки $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ може впливати на експресію генів, а й $25(\text{OH})\text{D}$ також здатний зв'язуватись з VDR, але з спорідненістю приблизно в 1000 разів нижчою у порівнянні з $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [104; 103]. Також, нещодавно було виявлено регуляторний вплив $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ на експресію мікроРНК і довгих некодуєчих РНК [92; 224]. Поширеність VDR у організмі може слугувати поясненням мультифункціональних властивостей вітаміну D, оскільки експресія рецептору спостерігається більш ніж у 30 тканинах [56].

Незважаючи на добре встановлену роль VDR у реалізації біологічної дії вітаміну D, не всі ефекти можна пояснити регуляцією експресії генів. Так, деякі фізіологічні ефекти спостерігаються протягом секунд або хвилин після стимуляції вітаміном D, що виключає активацію експресії генів та подальшого синтезу білка, які потребують значно більше часу. Такі ефекти пов'язані з негеномною дією вітаміну D, а саме зі здатністю кальцитріолу взаємодіяти з $1,25\text{D}_3$ -мембранно-асоційованим стероїд-зв'язуючим білком швидкої відповіді ($1,25\text{D}_3$ -MARRES), який також відомий як протеїн-дисульфід-ізомераза (PDIA3) [243]. PDIA3 — це білок ендоплазматичного ретикулу (ER), який бере участь у згортанні білка разом з іншими шаперонами, такими як калнексин або калретикулін. За межами ER PDIA3 локалізований у клітинній мембрані, ядрі, цитоплазмі та мітохондріях [294]. Цей білок бере участь у швидкому поглинанні кальцію та фосфату в клітинах кишечника, індукованому $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ та тісно пов'язаний з гомеостазом кальцію. PDIA3

взаємодіє з білком, що активує фосфоліпазу A2 (PLAA), що згодом призводить до активації фосфоліпази A2 (PLA2) та швидкої негеномної відповіді на $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. У результаті кальцій вивільняється в цитоплазму з подальшою активацією протеїнкінази C (PKC) або кальцій/кальмодулінзалежної протеїнкінази II (CaMKII). В результаті це призводить до індукції передачі сигналу, наприклад, шляхів протеїнкіназ, що активуються мітогеном (MAPK) та інших факторів транскрипції (STAT1-3, NF- κB). Також встановлено, що руйнування білка PDIA3 послаблює передачу сигналів PKA, PKC і приплив кальцію [186]. PDIA3 здатний впливати на експресію STAT3, регулюючи клітинне дихання та активує передачу сигналів STAT3 за індукції $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [185].

Останнім часом значна увага приділяється імуномодулюючим властивостям гормональної форми вітаміну D, що проявляються у впливі як на вроджений, так і на набутий імунітет. Про важливе значення вітаміну D для вродженого імунітету було відомо задовго до відкриття молекулярних механізмів його реалізації, підтвердженням чого слугують описи лікарів початку XX століття про актуальність споживання печінки тріски (багатої вітаміном D) та перебування на сонці для лікування туберкульозу [62]. Подальші дослідження виявили здатність активованих макрофагів та моноцитів, індукованих впливом прозапальних цитокінів, за наявності інфекції, активно експресувати 1α -гідроксилазу (CYP27B1), що сприяє утворенню $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ з попередника $25(\text{OH})\text{D}$. В свою чергу, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ аутокринним шляхом через комплекс VDR-RXR стимулює продукцію антимікробного пептиду кателіцидину [66; 74]. Окрім цього, частина утвореного $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ здатна виходити за межі клітини та впливати на лімфоцити, виконуючи паракринну функцію [108]. Також, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ здатен впливати на диференціацію та функціонування антигенпрезентуючих клітин, що призводить до зниження експресії головного комплексу гістосумісності. Як наслідок, це призводить до зменшення продукції інтерлейкіну-12 (IL-12) і підвищення продукції інтерлейкіну-10 (IL-10) [87]. Також,

експериментальними дослідженнями продемонстровано здатність $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ зменшувати експресію тол-подібних рецепторів (TLR) на моноцитах [289]. Вплив вітаміну D на набутий імунітет реалізується за рахунок пригнічення імунної відповіді за рахунок інгібування міграції та диференціації Т-клітин, таких як Т-хелпери 1 (Th1) та Т-хелпери 17 (Th17), що призводить до зменшення продукції прозапальних цитокінів – IL-17, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23, IL-2 а також IFN- α та TNF- α [55]. На рис.1.2. представлені основні джерела та напрямки біологічної дії вітаміну D (узагальнено за [62; 289; 120; 167]).

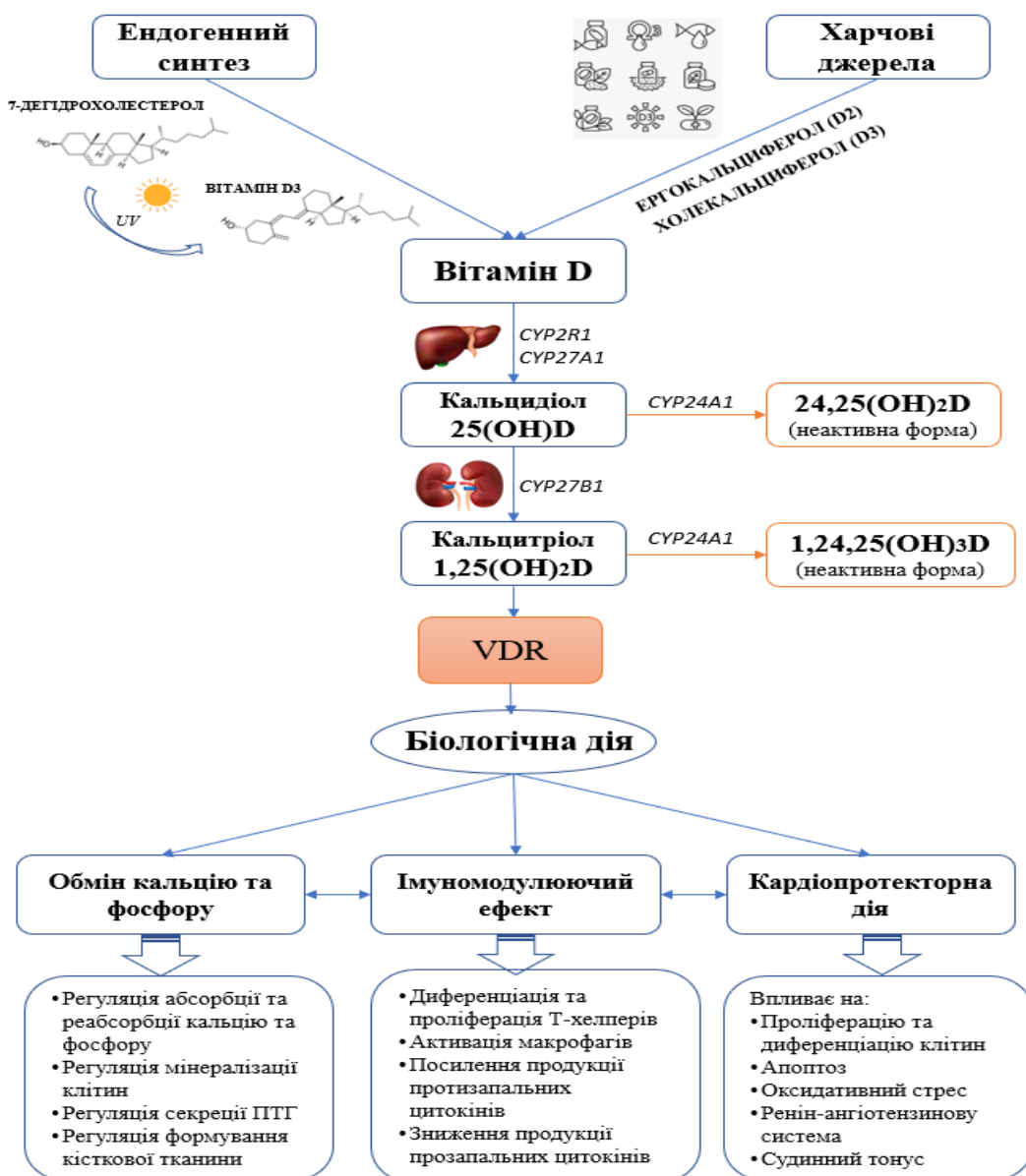


Рис. 1.2. Основні джерела та біологічні ефекти вітаміну D ([62; 289; 120; 167]).

1.2. Біохімічні механізми реалізації кардіопротекторної дії вітаміну D

Дефіцит вітаміну D асоціюється з рядом серцево-судинних захворювань, серед яких атеросклероз, ішемічна хвороба, гіпертензія, гіпертрофія серця, захворюваннями периферичних артерії [72]. Існує як прямий вплив вітаміну D на стан серцево-судинної системи, так і опосередкований – через вплив на судинні фактори ризику, до яких належить цукровий діабет, дисліпідемія, резистентність до інсуліну, ожиріння [193]. Прямий вплив вітаміну D на серцево-судинну систему пов'язаний з наявністю рецепторів VDR в кардіоміоцитах, гладком'язових клітинах судин, ендотеліальних клітинах, циркулюючих моноцитах, макрофагах, дендритних клітинах [73] та експресією в них CYP27B1 (25-гідроксивітамін D-1 α -гідроксилази), що забезпечує можливість внутрішньоклітинного утворення активної форми вітаміну D – 1,25(OH) $_2$ D $_3$ з попередника 25(OH)D $_3$ [183].

Вазопротекторний ефект вітаміну D пов'язують з модуляцією імунних і запальних процесів, регуляцією проліферації та міграції ендотеліальних клітин, впливом на експресію реніну та гомеостаз позаклітинного матриксу, здатністю зменшувати негативний вплив кінцевих продуктів глікації протеїнів та ліпідів на ендотеліальні клітини [180]. За рахунок регуляції експресії васкулярного ендотеліального фактора росту (VEGF) і матриксних металопротеїназ (MMP), вітамін D бере участь у модуляції проліферації ендотеліальних клітин та гомеостазу матриксу [191]. Відомо, що VEGF стимулює проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин і опосередковує ріст судин та ангіогенез [206], тоді як матриксні металопротеїнази регулюють ангіогенез і ремоделювання судин шляхом руйнування білків позаклітинного матриксу [120]. Вітамін D здатний індукувати регуляцію VEGF в ендотеліальних клітинах-попередниках, зрілих ендотеліальних клітинах та в гладком'язових клітинах судин, що визначає його роль у васкулогенезі, ангіогенезі та відновленні ендотелію [118]. Також вітамін D впливає на функціональний стан судин шляхом регуляції вмісту

колагену та еластину в судинній стінці. Зокрема, при дефіциті вітаміну D спостерігається знижений вміст еластину та підвищений вміст колагену в стінці аорти [38; 197].

Здатність впливати на функціональний стан ендотелію обумовлює участь вітаміну D в регуляції тонуусу судин. Так, дефіцит вітаміну D призводить до підвищення судинного тонуусу та посилення індукованої ангіотензином II вазоконстрикції мезентеріальних артерій [142]. Також, вітамін D зменшує ендотелій-залежне скорочення аорти щурів зі спонтанною гіпертензією через зменшення притоку кальцію в ендотеліальні клітини, що призводить до зменшення продукції ендотеліальних вазоконстрикторів [132]. Вітамін D нормалізував реактивність мезентеріальних артерій щурів зі спонтанною гіпертензією шляхом відновлення функції АТФ-чутливих K^+ каналів гладком'язових клітин, стимулював експресію фактора росту ендотелію судин, пригнічував активацію ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) та регулював секрецію натрійуретичного пептиду [210].

Недостатність вітаміну D є прозапальним чинником, що провокує розвиток ендотеліальної дисфункції та атерогенез [193]. За умов дефіциту вітаміну D посилюється продукція активних форм кисню у стінках судин, оскільки знижується активність антиоксидантних ензимів, у тому числі цитозольної мідь-цинк-вмісної супероксиддисмутази (CuZn-SOD) [37]. Також вітамін D здатний знижувати експресію НАДФН-оксидази, що продукує активні форми кисню [246]. Вітамін D здатний пригнічувати експресію медіаторів запалення, таких як TNF- α , циклооксигеназа 2 (ЦОГ-2) в аорті [167]. Крім того, вітамін D знижує експресію рецептора тромбоксану (TR), пригнічує активацію ядерного фактора-кВ (NF-кВ), знижує експресію IL-6 в ендотеліальних клітинах [79]. Вітамін D впливає на Т-клітинні імунні реакції через його здатність пригнічувати активність Т-хелперів типу 1 (Th1) і Т-хелперів типу 17 (Th 17) і активувати Т-хелпери типу 2 (Th 2) [166].

Вітамін D та нітроген монооксид (NO). Важливою ланкою впливу вітаміну D на стан серцево-судинної системи є його здатність впливати на

продукування та біодоступність мультифункціонального газотрансмітера – нітроген монооксиду (NO). Так, вітамін D підвищує експресію ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) [178], збільшує співвідношення димерів до мономерів eNOS, активує фосфорилування eNOS [254], що призводить до підвищення NO-синтазної активності і збільшення продукції NO [254]. Також вазопротекторна дія вітаміну D може реалізуватись через активацію синергічних сигнальних шляхів, зокрема опосередкованих циклічною аденозинмонофосфат-активованою протеїнкіназою (AMPK), фосфоінозитид-3-кіназою (PI3K)/Akt, p38 мітоген-активованою протеїнкіназою (MAPK) [61].

На противагу здатності кальцитріолу посилювати продукцію NO, дефіцит вітаміну D та порушення функціонування VDR викликає зниження експресії eNOS та зниження вазодилатації. Наприклад, у VDR-дефіцитних щурів реєструвалось зниження ендотелій-залежної вазодилатації через зниження експресії eNOS [254]. У мишей із функціонально неактивними рецепторами VDR, які у ранньому віці піддавались впливу дефіциту вітаміну D, спостерігалось зниження виробництва NO та дисфункція ендотелію судин [193].

Вітамін D та гідроген сульфід (H₂S). Біологічним синергістом NO є гідроген сульфід (H₂S), що активно синтезується в серцево-судинній системі і регулює її функціональний стан в нормі та при різних патологічних станах [135]. В серці та судинах H₂S переважно синтезується з L-цистеїну за участі цистатіонін-γ-ліази (CSE) та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази разом з цистатіонамінотрансферазою (шлях CAT/3-MST) [160; 135]. Ці питання будуть розглянуті більш детально в окремому розділі.

На теперішній час, інформація щодо ролі вітаміну D в регуляції метаболізму H₂S у різних органах і тканинах в нормі і, особливо, за різних патологічних станів залишається обмеженою. В роботі Wiliński B. et al. (2012) було вперше засвідчено, що введення вітаміну D₃ підвищує концентрацію H₂S в міокарді здорових щурів [258]. Manna P. et al. виявили здатність кальцитріолу

підвищувати активність цистатіонін- γ -ліази в культурі клітин жирової тканини 3T3L1 [163].

Існують дані про здатність 1,25(OH) $_2$ D впливати на експресію та активність ензиму транссульфування - цистатіонін- β -синтази (CBS) із певними особливостями залежно від рівня експресії VDR у різних тканинах [139]. Як відомо, CBS забезпечує утилізацію гомоцистеїну та утворення H $_2$ S здебільшого в головному мозку, печінці та нирках, але цей ензим практично не експресується в серцево-судинній системі [240]. Дефіцит вітаміну D асоціюється з підвищенням рівня гомоцистеїну в плазмі крові [36], що може опосередковано свідчити про порушення процесів транссульфування і вплив на метаболізм H $_2$ S, а також є можливим механізмом впливу на стан серця та судин.

Важливу роль в метаболізмі вітаміну D відіграє глутатіон, що необхідний для перетворення холекальциферолу в активні метаболіти 25(OH)D і 1,25(OH) $_2$ D, а також підвищує біодоступність 25(OH)D [196]. З іншого боку, вітамін D сприяє підвищенню рівня глутатіону і зменшує оксидативний стрес [115]. Донори H $_2$ S стимулюють продукцію глутатіону в міокарді [251], відповідно, не виключається вплив модуляторів обміну H $_2$ S на біологічну дію вітаміну D, однак це питання потребує окремого вивчення.

Вітамін D та кардіометаболічні чинники. Дефіцит вітаміну D є загальноновизнаним супутнім розладом за ожиріння, що свідчить про певну роль жирової тканини у зниженні рівня головної циркулюючої в крові форми вітаміну D - 25(OH)D [40]. Існують кілька підходів, що пояснюють зв'язок ожиріння з низьким рівнем кальцидіолу в плазмі крові. Порушення раціону харчування з недостатнім споживанням продуктів з високим вмістом вітаміну D та недостатнє перебування під впливом сонячного світла, що характерно для осіб з ожирінням з обмеженою фізичною активністю, призводить до зниження ендогенного синтезу та екзогенного надходження вітаміну D [112]. Інша гіпотеза пов'язана з фізичними властивостями вітаміну D. Так, будучи ліпофільним, вітамін D здатен розчинятись у великих жирових запасах, що

призводить до зниження його біодоступності та зменшення рівня 25(OH)D в циркуляторному руслі [112]. Встановлено, що за умов ожиріння змінюється експресія багатьох печінкових ензимів із родини цитохрому P450 [211], а саме пригнічується експресія Cyp2r1(25-гідроксилази) у печінці, що призводить до зниження перетворення холекальциферолу у 25(OH)D [211]. У експерименті на щурах, що знаходились на високожировій дієті, спостерігалось зниження експресії CYP2R1 і CYP27B1 [52]. Експресія CYP2R1 знижується в позапечінкових тканинах і тканинах печінки щурів за умов дієтіндукованого ожиріння, що асоціюється з розвитком дефіциту вітаміну D [85]. Високий індекс маси тіла тісно асоціюється з дефіцитом вітаміну D [195]. Також, існують дані про ефективність прийому вітаміну D для зменшення маси тіла [131; 232].

Існують факти, що дозволяють розглядати дефіцит вітаміну D не лише як наслідок ожиріння, а й як фактор ризику його виникнення [49; 249]. Вітамін D стимулює секрецію інсуліну через активацію β -клітини підшлункової залози у відповідь на підвищення рівня глюкози [134; 63], а також запобігає патологічній диференціації β -клітин [182]. При дефіциті вітаміну D спостерігається зниження чутливості клітин-мішеней до інсуліну, що є чинником розвитку цукрового діабету [44]. Вітамін D може впливати на секрецію та біологічну дію інсуліну через регуляцію дії інсулінових сенситаїзерів (лептину, адипонектину) [242] та здатність підвищувати експресію рецепторів інсуліну [279]. З іншого боку, підвищений рівень паратгормону (ПТГ), характерний для дефіциту вітаміну D, здатний призводити до притоку кальцію в адипоцити, сприяючи ліпогенезу [262]. З огляду на можливість виникнення вторинного гіперпаратиреозу за умов дефіциту вітаміну D, подальше збільшення внутрішньоклітинного кальцію в адипоцитах може бути відповідальним за зростання експресії синтази жирних кислот, ключового регуляторного ферменту в процесі синтезу ліпідів та зниження активності ліполізу [53]. Також, за умов дефіциту вітаміну D спостерігалось посилення ліпогенезу та синтезу жирних кислот у печінці

(зростали рівні PPAR γ , SREBP1c, ChREBP та синтази жирних кислот (FAS)), при цьому рівні маркерів бета-окислення були знижені (PPAR α та фосфоенолпіруваткарбоккіназа PEPCK) [53]. 1,25(OH) $_2$ D має здатність підтримувати шлях WNT/ β -катенин, що пригнічується в процесі адипогенезу, тим самим стримуючи синтез жирової тканини [143]. В преадипоцитах 1,25(OH) $_2$ D чинить інгібуючу дію на процеси диференціації, інгібуючи транскрипційний фактор C/EBP β [214]. Іншим шляхом впливу 1,25(OH) $_2$ D на метаболізм жирової тканини є здатність активувати апоптоз адипоцитів, за механізмом пов'язаним з активацією Ca $^{2+}$ -залежного μ -кальпаїну та Ca $^{2+}$ /кальпаїн-залежної каспази-12 [222].

Дефіцит вітаміну D є фактором ризику дисліпідемії. На тлі гіповітамінозу вітаміну D виявляється низький рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) [34], а між рівнем 25(OH)D у сироватці крові та рівнями ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) й тригліцеридів виявляється обернена залежність [123]. Прийом вітаміну D сприяє зниженню рівнів загального холестерину, ЛПНЩ та тригліцеридів [123].

Слід зауважити, що надмірне надходження вітаміну D в організм є чинником, що порушує морфофункціональний стан серцево-судинної системи, нирок, шлунково-кишкового тракту [170; 179], що реалізується через порушення кальцієво-фосфорного обміну, кальцифікацію судин, стимуляцію ренін-ангіотензин-альдостеронової системи та активацію імунозапальних процесів [130; 73; 194]. Привертає увагу той факт, що в експериментальних умовах кальцифікація атеросклеротичних бляшок в судинах посилюється як за недостатності, так і за надлишку вітаміну D в організмі [84]. Одночасне застосування високих доз вітаміну D з ніотином викликає кальцифікацію судин експериментальних тварин, у той час як введення донору H $_2$ S – натрій гідрогенсульфіду (NaHS) зменшує цей ефект [270; 149]. Отже, визачення взаємозв'язку між вітаміном D та сульфідним обміном залишається актуальним.

На рис. 1.3. узагальнені основні напрямки кардіоваскулярної дії активної форми вітаміну D (узагальнено і доповнено за [53; 170; 61; 178]).

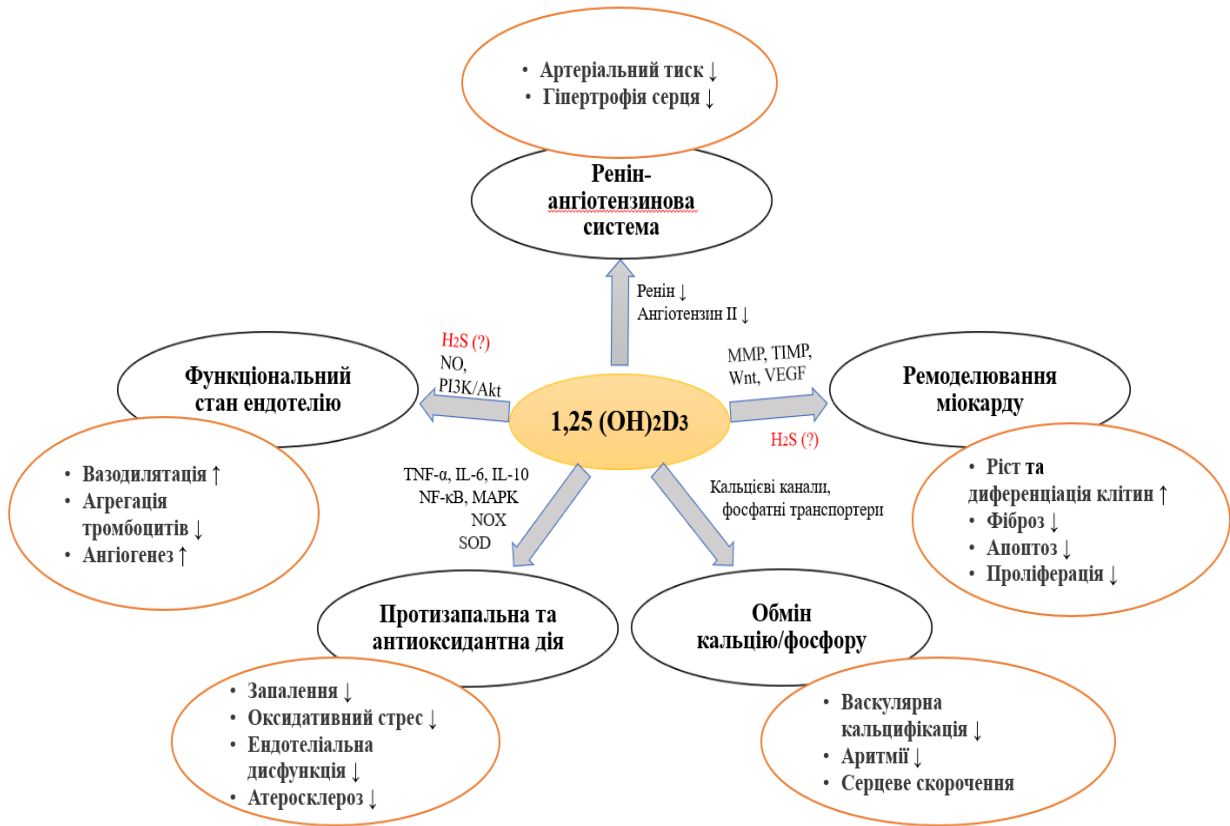


Рис. 1.3. Ключові напрямки та механізми реалізації кардіопротекторної дії активної форми вітаміну D (узагальнено і доповнено за [53; 170; 61; 178]).

1.3. Особливості обміну гідроген сульфід у серцево-судинній системі та механізми H₂S-залежної кардіопротекції

Як відомо (рис.1.4.), ендогенний H₂S в серцево-судинній системі (як і в інших тканинах) може перебувати у недисоційованій «газовій» формі та у вигляді гідрогенсульфід-аніону (HS⁻) у співвідношенні 1:1, в плазмі крові та позаклітинній рідині співвідношення HS⁻ / H₂S виявляється дещо вищим (3:1), за цих умов сульфід-аніон (S²⁻) в клітинах практично не виявляється [276; 105; 136].

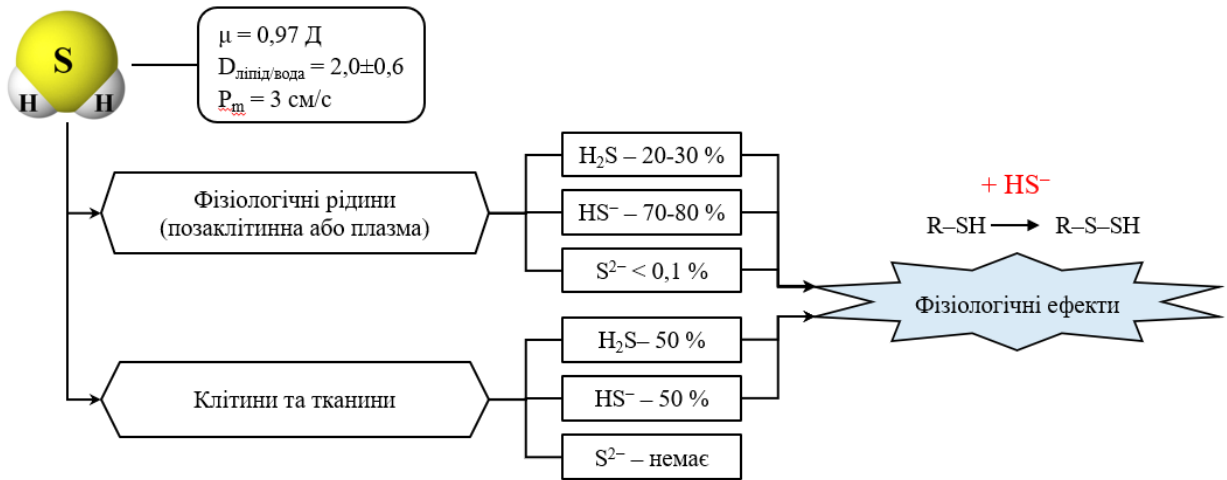


Рис. 1.4. Розподіл H_2S в організмі. Примітки: μ – дипольний момент, диполь (Д); $D_{\text{ліпід/вода}}$ – коефіцієнт розподілу ліпід/вода; P_m – коефіцієнт проникності, см/с [276; 105; 136].

У формі H_2S цей медіатор легко долає клітинні мембрани через високу ліпофільність, але у формі HS^- проявляє високу біологічну активність, оскільки легко реагує з електрофілами і модифікує SH-групи чисельних молекулярних мішеней, що забезпечує реалізацію множинних фізіологічних ефектів [276; 105; 136].

Шляхи утворення H_2S в серцево-судинній системі. В серці та судинах ссавців ендogenous H_2S синтезується переважно ензиматичним шляхом за допомогою цистатіонін- γ -ліази (CSE), 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (3-MST) у поєднанні з цистеїнамінотрансферазою (CAT) [160; 135; 188]. CSE є піридоксаль-5-фосфат-залежним ензимом, що експресується в багатьох тканинах, включаючи печінку, нирки, серце та судини, і використовує в якості субстратів L-цистеїн та L-гомоцистеїн в реакціях транссульфування [122]. Інший шлях продукції H_2S включає піридоксаль-5-фосфат-залежну CAT та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазу (3-MST), кофактором якої є Zn^{2+} [160; 135]. В реакції трансамінування CAT спочатку перетворює L-цистеїн на 3-меркаптопіруват, з якого в подальшому 3-MST забезпечує утворення H_2S в процесі десульфування. На каталітичні властивості 3-MST істотно впливає присутність редуцентів, таких як тіоредоксин чи дигідроліпоева кислота

[265]. Мало дослідженими, але можливими шляхами утворення H_2S в серці та судинах є 1) реакції відновлення тіосульфат-аніону ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) за допомогою тіосульфатсульфуртрансфераз (в присутності відновленого глутатіону - GSH) та /або 3-MST (в присутності тіоредоксину чи дигідроліпоевої кислоти); 2) реакція десульфурування L-цистеїну за участі піридоксаль-5-фосфат-залежної цистеїніл-тРНК-синтетази (CARS) [135].

Неферментативними шляхами утворення H_2S у серцево-судинній системі є вивільнення з L-цистеїну за участі Fe^{3+} та піридоксаль-5-фосфату, а також безпосереднє утворення з персульфідів, полісульфідів та тіосульфатів під дією редуктантів – GSH, тіоредоксину, дигідроліпоевої кислоти [169]. На рис.1.5. схематично представлено основні шляхи біосинтезу H_2S в серцево-судинній системі та їх взаємозв'язок.

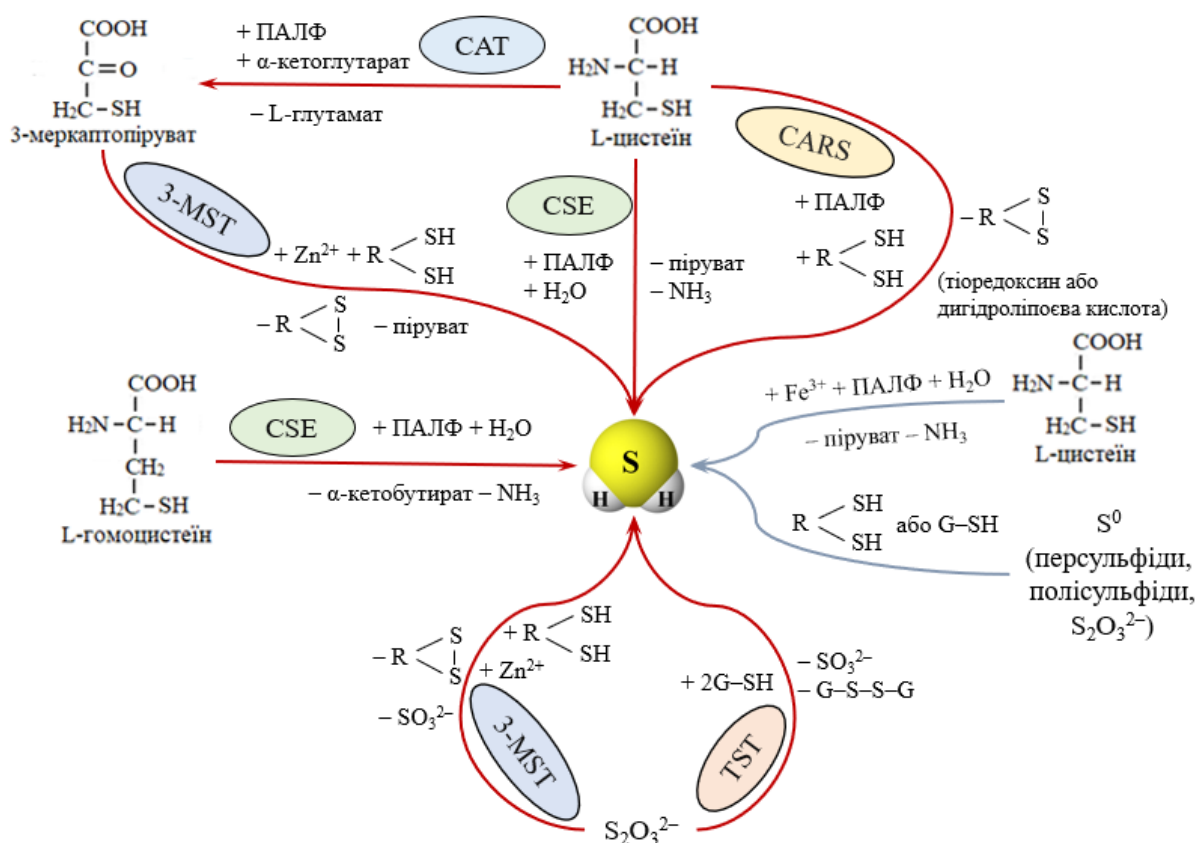


Рис. 1.5. Шляхи біосинтезу H_2S в серцево-судинній системі (узагальнено і доповнено за [160; 135; 188; 276; 122].)

Примітки: \rightarrow –ензиматичний шлях; \rightarrow – неензиматичний шлях; CSE – цистатіонін- γ -ліаза; CAT – цистеїнамінотрансфераза; 3-MST – 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза; CARS – цистеїніл-тРНК-синтетаза; TST – тіосульфатсульфуртрансфераза; ПАЛФ – піридоксаль-5-фосфат; G-SH – відновлений глутатіон; G-S-S-G –глутатіондисульфід.

Шляхи катаболізму H_2S в серцево-судинній системі. Основні процеси катаболізму H_2S в організмі відбуваються за рахунок окиснення в мітохондріях і є універсальними для різних органів і тканин [225]. Початковий етап каталізується ензимом сульфідхіонредуктазою (SQR), що забезпечує окиснення H_2S та відновлення власного флавінового кофактора (ФАД) в присутності сульфід-аніону (SO_3^{2-}) або GSH [259]. В каталітичному циклі за участі SQR відбувається послідовне відновлення ФАД у ФАДН₂ за допомогою H_2S , з подальшим відновленням убихінону за участі ФАДН₂. Це є зв'язуючою ланкою між метаболізмом H_2S та дихальним ланцюгом і процесом окисного фосфорилування. Функціонування такого циклу SQR призводить до утворення SQR-персульфідних інтермедіатів на залишках цистеїну активного центру ензиму. У тканинах людини ці проміжні персульфіди в наступному переносяться на GSH з утворенням глутатіон персульфіду (GSSH) [127]. Після початкового окиснення за допомогою SQR наступним важливим ензимом у мітохондріальному катаболічному шляху H_2S є персульфіддіоксигеназа (ETHE1), що каталізує оксигензалежне окиснення глутатіон персульфіду (GSSH), з утворенням сульфіту (SO_3^{2-}) та глутатіону [216]. Утворений сульфід може потім піддаватися подальшому окисненню до сульфату (SO_4^{2-}) сульфітоксидазою (SUOX). Мутації в гені ETHE1 у людини призводять до етилмалонової енцефалопатії - тяжкого вродженого порушення метаболізму, що характеризується накопиченням сульфідів та їх метаболітів, що підкреслює системне значення ETHE1 у цьому процесі [205]. Тіосульфатсульфуртрансфераза (TST), також відома як роданеза, є ще одним мітохондріальним ферментом, який відіграє значну роль у катаболізмі H_2S у серцево-судинній системі. TST може каталізувати перенесення сірки з

персульфідів на тіосульфат ($S_2O_3^{2-}$) [158]. Існують докази існування специфічної тіосульфатглютаціонсульфуртрансферази (TSTD1), яка необхідна для виробництва S-сульфанілглютаціону (GSS^-), що є центральним проміжним продуктом у метаболізмі H_2S [152]. TST також може каталізувати тіосульфат-залежне перетворення глютаціону на GSS^- , тим самим забезпечуючи зв'язок між початковим окисненням H_2S за допомогою SQR, що продукує тіосульфат та подальшим окисненням GSS^- за допомогою сульфурдіоксигенази (SDO) [172]. На рис. 1.6. схематично представлені основні шляхи катаболізму H_2S в серцево-судинній системі та утворення ключових інтермедіатів (узагальнено і доповнено за [158; 127; 225]).

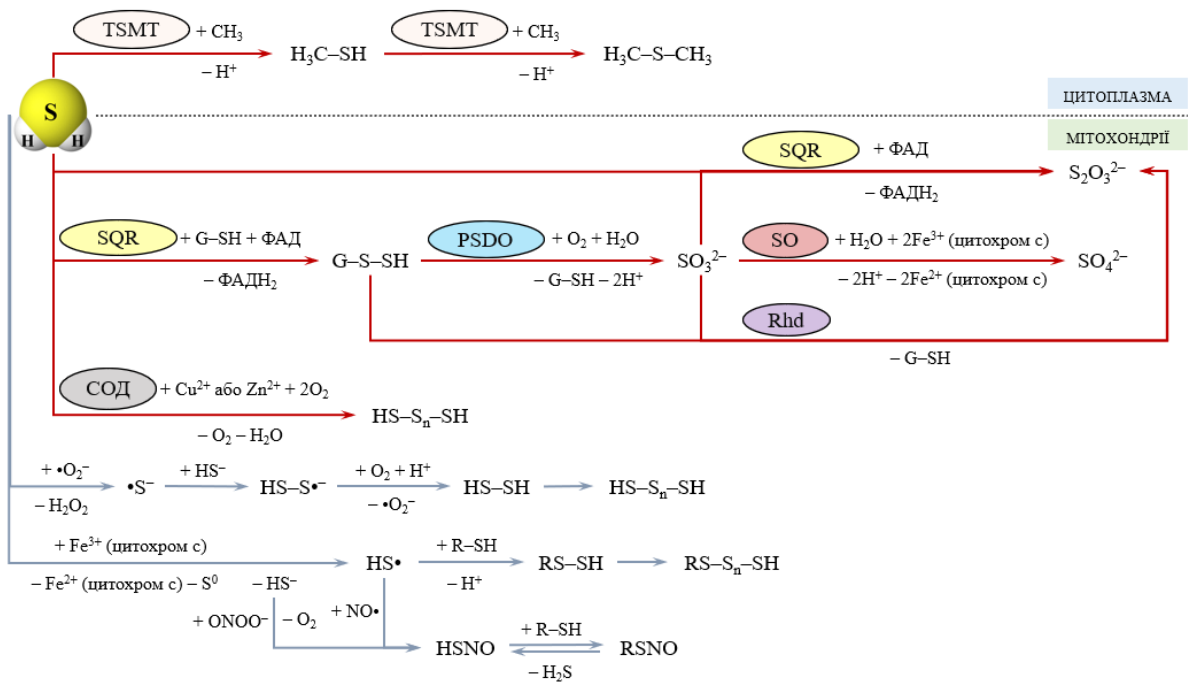


Рис. 1.6. Шляхи утилізації H_2S в серцево-судинній системі. Примітки: \rightarrow – ензимний шлях; \longrightarrow – неензимний шлях; SQR – сульфідхіноноксидоредуктаза; PSDO – персульфіддіоксигеназа; Rhd – роданеза; SO – сульфітоксидаза; COД – супероксиддисмутаза; TSMT – тіол-S-метилтрансферази; G-SH – відновлений глютаціон; GS-SH – глютаціон персульфід; ФАД – флавінаденіндинуклеотид; ФАДН₂ – флавінаденіндинуклеотид відновлений; $\bullet O_2^-$ – супероксид аніон-радикал; HS \bullet – тіоловий радикалу; $\bullet S^-$ – тіловий радикал; HSS \bullet^- – пертіловий радикал; HS-SH – персульфід; HS-S_n-SH –

полісульфід; RS–SH – тіол або білок персульфід; RS–S_n–SH – тіол, протеїн, полісульфід; RSNO – нітрозотіол.

Механізми кардіопротекторної дії H₂S є надзвичайно різноманітними, оскільки реалізуються через чисельні молекулярні мішені на рівні протеому, транскриптому та геному і включають вплив на оксидативний стрес, запалення, апоптоз, ангиогенез, фіброз, активність іонних каналів тощо [160; 135; 156; 155; 199], окремі аспекти яких будуть розглянуті далі.

Антиоксидантні ефекти H₂S в серцево-судинній системі. Окислювальний стрес, що характеризується дисбалансом між продукцією прооксидантів та активністю антиоксидантних систем, відіграє центральну роль у патогенезі багатьох серцево-судинних захворювань, включаючи ішемічно-реперфузійне ушкодження, інфаркт міокарда та серцеву недостатність [113]. H₂S здатен безпосередньо знешкоджувати реактивні форми кисню (ROS) та реактивні форми азоту (RNS), такі як супероксидний аніон, гідроксильні радикали, пероксинітрит та пероксид водню, тим самим знижуючи рівень окислювального стресу в серцево судинній системі [223]. Окрім прямого знешкодження вільних радикалів, H₂S здатен підсилювати ендогенні антиоксидантні системи, зокрема шляхом активації транскрипційного фактора Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) [113]. Активація Nrf2 призводить до підвищення експресії генів антиоксидантних ферментів, серед яких гемоксигеназа-1 (HO-1), глутатіонредуктаза, глутатіон S-трансфераза, тіоредоксин та каталаза [113; 251]. Ці ензими відіграють ключову роль у захисті клітин від окисного пошкодження. Також H₂S може збільшувати рівень важливого клітинного антиоксиданту – відновленого глутатіону (GSH) шляхом активації транспорту цистеїну та регуляції експресії ензимів, залучених до його синтезу, зокрема каталітичної субодиниці глутаматцистеїнлігази (γ-глутамілцистеїнсінтетази) [114]. Крім того, H₂S може пригнічувати активність НАДФН-оксидази – ензиму, що є основним продуцентом ROS у серцево-судинній системі [156; 280]. Також H₂S

демонструє здатність інгібувати комплекс IV мітохондріального дихального ланцюга, що може впливати на продукцію ROS, а також зберігати функцію мітохондрій після реперфузії, підвищуючи ефективність комплексів I та II, що особливо важливо для зменшення ішемічно-реперфузійного ушкодження міокарду [227].

Дослідження демонструють здатність H_2S проявляти протекторні властивості при кардіотоксичності, спричиненої лікарськими препаратами. Так за умов доксорубіцин-індукованої кардіотоксичності, H_2S активує шлях SLC7A11/GSH/GPx4, тим самим зменшуючи фероптоз та пошкодження серця. Цей процес реалізується через S-сульфгідрацію протеїну Keap1, що призводить до активації Nrf2 та подальшого підвищення експресії антиоксидантних ензимів [280].

Протизапальні та антиапоптотичні ефекти H_2S . Запалення є ключовим фактором у розвитку та прогресуванні багатьох серцево-судинних захворювань. H_2S проявляє виражену протизапальну дію через інгібування активації та ядерної транслокації ядерного фактора каппа В (NF- κ B), який являється ключовим активатором експресії прозапальних генів [151]. Інгібування NF- κ B призводить до зниження продукції прозапальних цитокінів, таких як фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α), інтерлейкін-6 (IL-6) та інтерлейкін-1 бета (IL-1 β), які відіграють значну роль у розвитку серцево-судинних захворювань [88]. Встановлена здатність H_2S підвищувати експресію протизапального інтерлейкіну-10 (IL-10) [156].

Ендогенний H_2S відіграє важливу роль у модуляції імунної відповіді судин. Дослідження демонструють здатність H_2S сприяти диференціації та проліферації Treg-клітин (регуляторних T-клітин) через активацію АМФ-активованої протеїнкінази (АМПК) [290]. Зростання кількості Treg-клітин призводить до послаблення судинного імунного запалення [76]. H_2S знижує адгезію та інфільтрацію лейкоцитів у серцеву тканину, що є важливим етапом у розвитку запальної реакції [111]. Встановлено, що H_2S може впливати на різні запальні шляхи, включаючи TLR4/MyD88/NF- κ B та JAK2/STAT3 [274].

Апоптоз, або програмована клітинна смерть, є важливим фактором у розвитку серцево-судинних захворювань, особливо при ішемічно-реперфузійному ушкодженні та інфаркті міокарда [83]. H_2S проявляє значні антиапоптичні ефекти в серцево судинній системі через активацію сигнальних шляхів фосфатидилінозитол-3-кіназа/протеїнкіназа В (PI3K/Akt) та позаклітинної сигнал-регульованої кінази 1/2 (ERK1/2), що може сприяти виживанню клітин [282]. Також H_2S здатен підвищувати експресію антиапоптичних білків, таких як Bcl-2 та Bcl-xL та знижувати рівень проапоптичного білка Bax [219]. H_2S може запобігати мітохондріальній дисфункції та подальшому вивільненню проапоптичних факторів, таких як цитохром С з мітохондрій у цитозоль, що є ключовим етапом початку апоптозу [267]. Також показано здатність H_2S пригнічувати активацію каспази-3, ключового виконавчого ензиму апоптозу, безпосередньо блокуючи процес клітинної смерті. За умов ішемічно-реперфузійного ушкодження H_2S зменшує апоптоз шляхом посилення фосфорилювання GSK-3 β , що призводить до інгібування відкриття мітохондріальної пори перехідної проникності (mPTP), запобігаючи вивільненню проапоптичних факторів [263]. Донори H_2S можуть індукувати аутофагію та захищати ендотеліальні клітини від апоптозу, викликаного окисленими ліпопротеїнами низької щільності (Ox-LDL), шляхом активації Sirt1 [292].

Вплив H_2S на іонні канали. Іонні канали відіграють вирішальну роль у регуляції електричної активності та скоротливості серця, а також у контролі судинного тону. H_2S має здатність модулювати функцію різних іонних каналів через молекулярні механізми сульфгідрування / десульфгідрування та регуляцію експресії їхніх субодиниць у кардіоміоцитах та гладеньких міоцитах судин [155; 199]. Особливо важливим є вплив H_2S на АТФ-залежні калієві канали (КАТР), які відіграють важливу роль у метаболічному сигналінгу та протекції серця від ішемічного ушкодження [155]. Активація КАТР каналів під дією H_2S спричиняє інгібування кальцієвих каналів, гіперполяризацію мембран гладеньких міоцитів та кардіоміоцитів, викликає

вазодилатацію та регулює скоротливість серця, тим самим захищаючи міокард від ішемічно-реперфузійного ушкодження [204; 199]. H_2S також може модулювати інші іонні канали, такі як потенціал-залежні калієві канали (K_v7) та інгібувати кальцій-активовані калієві канали великої провідності (BK), сприяючи вазодилатації [155]. Дослідження на кардіоміоцитах, отриманих з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини (hiPSC) показали, що H_2S може пригнічувати потенціал дії, вихідні калієві струми та L-тип кальцієвих струмів, що свідчить про його прямий вплив на електричну активність серцевих клітин [285]. Встановлено, що H_2S може інгібувати L-тип кальцієвих каналів як у гладких м'язах судин, так і в кардіоміоцитах, що призводить до зменшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, вазодилатації та збільшення тривалості потенціалу дії [156]. Крім того, H_2S може модулювати транзиторні рецепторні потенційні канали (TRP), зокрема TRPV4 канали в ендотеліальних клітинах, стимулюючи продукцію вазодилатуючих агентів, таких як NO та простагліцилін, що сприяє регуляції судинного тонуусу [181].

Вплив H_2S на ангиогенез, фіброз та ремоделювання серця та судин. H_2S являється ендogenousним стимулятором ангиогенезу, регулюючи різні сигнальні шляхи, включаючи активацію KATP каналів, сигнальну систему фактора росту ендотелію судин (VEGF) через активацію AKT та шляхи гіпоксія-індукованого фактора-1 α (HIF-1 α) [282]. H_2S може стимулювати міграцію та проліферацію ендотеліальних клітин, а також посилювати їх морфогенез, що є ключовими етапами у формуванні нових кровоносних судин [95]. S-сульфгідрація протеїнів, зокрема специфічного протеїну 1 (SP-1), є важливою для підтримки ангиогенної активності ендотеліоцитів [286]. Встановлено, що H_2S сприяє ангиогенезу, інгібуючи мітохондріальний електронний транспорт та окисне фосфорилування, що призводить до збільшення споживання глюкози та гліколітичного виробництва АТФ, необхідного для міграції ендотеліальних клітин [162]. Крім того, H_2S стимулює шлях VEGF в ендотеліальних клітинах через сульфгідрування рецептора VEGFR2,

збільшуючи його димеризацію, аутофосфорилування та активацію, що є критично важливим для VEGF-залежного ангиогенезу [286]. H_2S здатен запобігати фіброзу, інгібуючи шлях трансформуючого фактора росту бета 1 (TGF- β 1)/SMAD та регулюючи активність матриксних металопротеїназ (MMPs) та тканинних інгібіторів металопротеїназ (TIMPs) [233]. Також H_2S може знижувати рівень профібротичних протеїнів, зокрема колагені типів I і III, періостину та остеопонтину. H_2S знижує активність ангіотензину II в серцево-судинній системі, що призводить до зменшення гіпертрофії та фіброзу міокарда [154]. Крім того, H_2S може пригнічувати експресію гена Kruppel-like factor 5 (KLF5), зменшуючи гіпертрофію серця [173]. Ендотеліальний H_2S відіграє важливу роль протидії процесам ремоделювання, частково через механізми пов'язані з впливом на систему NO [150].

В окремих роботах доведено, що донори H_2S зменшують кальцифікацію судин за дії надлишкових доз вітаміну D [270; 149; 250]. Yang R. (2016) та Li H. (2017) виявили зменшення ознак ЕПР-стресу в аорті під впливом NaHS у щурів з моделлю кальцифікації судин, викликаної вітаміном D та ніотином [270; 149]. Застосування NaHS в дозі 50 мкмоль/кг/добу упродовж 8 тижнів спричинило зниження рівня кальцію та фосфору, зменшило ознаки кальцинозу аорти, інгібувало остеогенну трансформацію гладеньких міоцитів судин щурів за експериментальної діабетичної нефропатії [250]. Донори H_2S (NaHS, Na_2S) зменшували остеобластну трансдиференціацію інтерстиціальних клітин, інгібували експресію остеокальцину та лужної фосфатази в культурі аортальних клапанів людини [228].

Взаємодія H_2S з іншими газотрансмітерами в серцево-судинній системі. Встановлено, що H_2S може збільшувати біодоступність NO шляхом інгібування його деградації та стимулювання активності ендотеліальної NO синтази (eNOS), що є важливим для процесів регуляції судинного тону та запобігання атеросклерозу [181]. Також NO та H_2S можуть підвищувати рівень гемоксигенази-1 (HO-1), ферменту, який відповідає за продукцію CO, що свідчить про потенційну скоординовану захисну реакцію, що включає всі три

газотрансмітери [77]. Також H_2S може реагувати з NO з утворенням нітросилу (HNO), який також проявляє кардіопротекторні властивості та може сприяти дилатації судин [252]. Крім того, ангиогенні ефекти H_2S та NO є взаємозалежними, що підкреслює тісну координацію між цими двома газотрансмітерами у підтримці функціонального стану судин. Тривале введення екзогенного донору гідроген сульфідру - NaHS призводить до зниження артеріального тиску та збільшення продукції NO шляхом посилення фосфорилування ендотеліальної NO -синтази (eNOS) через активацію сигнального шляху $\text{PPAR-}\delta/\text{Akt/AMPK}$ [264]. Показано, що H_2S може запобігати нітрузуванню цистеїну 443 (Cys443), що призводить до підвищення ендогенної продукції NO , демонструючи механізм, за допомогою якого H_2S може регулювати NO -залежний сигналінг [284].

Резюме. Таким чином, вітамін D та H_2S відіграють важливу роль у регуляції біохімічних процесів та фізіологічних функцій серцево-судинної системи, що впливає на гомеостаз та вітальність організму в цілому. Вітамін D гіпотетично може виступати бустером по відношенню до утворення H_2S в різних органах і системах, однак його роль в регуляції сульфідного обміну потребує подальшого вивчення. Особливий інтерес представляють дослідження ролі H_2S -залежних механізмів в реалізації кардіопротекторних ефектів вітаміну D за поширених патологічних станів («хвороб цивілізації»), до прикладу за ожиріння та асоційованих з ним коморбідних станів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні тварини, моделі, дизайн дослідження

Досліди виконані на 235 білих лабораторних щурах-самцях популяції Вістар експериментальної біологічної клініки (віварію) Вінницького національного університету (далі - ВНМУ) ім. М.І. Пирогова. Усі етапи дослідження проводились із дотриманням принципів біоетики відповідно до Директив Ради Європи (Directive 2010/63/EU) [86], «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на I-VII Національних конгресах України з біоетики (Київ, 2001-2019), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006, ст. 26), що засвідчено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол №9 від 01.11.2018, № 4 від 18.03.2026).

Усі тварини утримувались в стандартних умовах віварію ВНМУ ім. М.І. Пирогова із забезпеченням 12-годинного світлового режиму день/ніч, температури 20-24 °С і відносної вологості повітря 50-60 %, із розміщенням у стандартних пластикових клітках, з вільним доступом до води та їжі (*ad libitum*). Джерелом води була охолоджена кип'ячена вода у скляних поїлках, раціон віварію включав фуражне зерно, хліб, коренеплоди (буряк, морква), повнораціонний брикетований комбікорм.

Перед включенням у дослідження тварини з метою акліматизації та адаптації до стандартної лабораторної дієти знаходились на карантині (у відокремлених приміщеннях) протягом 10 діб. Під час процедури відбору та за 1 добу перед початком дослідження тварин оглядав зоотехнік віварію задля включення до експерименту лише здорових статевозрілих щурів-самців із початковою масою 160-190 г. Тварин розподіляли на серії дослідів та

відповідні групи випадковим чином, дотримуючись принципу найменших міжгрупових розбіжностей щодо маси і довжини тіла. У кожену групу включали 8-10 особин і передбачали резерв (1-2 щура), 1 раз на тиждень тварин зважували, вимірювали назоанальну довжину, фіксували необхідні соматометричні параметри. Усі маніпуляції проводились зранку (з 9⁰⁰ до 11⁰⁰), з використанням засобів, що пройшли належний метрологічний контроль. Фінальний етап кожного експерименту завершувався евтаназією тварин, що здійснювалась методом швидкої декапітації під тіопенталовим наркозом (тіопентал натрію 100 мг/кг внутрішньоочеревинно).

Харчування тварин (дієти). У карантині та під час експериментів тварини отримували стандартний повнораціонний гранульований корм для лабораторних гризунів (ПК120-2, ТОВ «НВП Ф.У.Д.», Україна), збалансований за усіма макро-та мікронутрієнтами (у т.ч. з вмістом кальцію - 0,89 % та фосфору - 0,79 %). Стандартна дієта включала 21,7 % протеїнів, 14,4 % жирів, 63,9 % вуглеводів (енергетична цінність – 271,6 ккал/ 100 г).

В одній серії дослідів для моделювання аліментарного (дієт-індукованого) ожиріння була використана апробована висококалорійна дієта (ВКД) із підвищеним вмістом жирів, як описано [226, 128]. ВКД складалась з 60 % стандартного корму, 10 % яйця, 10 % ляду, 9 % цукру, 5 % арахісу, 5 % цільного сухого молока, 1 % соняшникової олії. В умовах нашого досліду ВКД за калоражем включала 15,2 % протеїнів, 41,3 % жирів, 43,5 % вуглеводів (енергетична цінність – 433,8 ккал/100 г). Корм вносили в годівниці у надлишковій кількості (із розрахунку 25-28 г сухого корму на 1 особину), щоденно оцінювали кількість спожитого корму, залишки корму зважували і видаляли.

Дизайн дослідження. Експериментальна частина дисертаційного дослідження складалась з трьох основних етапів (рис. 2.1.): 1) вивчення впливу активної форми вітаміну D - кальцитріолу (1,25-дигідроксिवітаміну D₃) на показники метаболізму гідроген сульфіді та експресію гена *CSE* в серцево-судинній системі щурів; 2) вивчення впливу кальцитріолу на медіатори

апоптозу, ЕПР-стресу, оксидативного стресу, запалення, дисфункції ендотелію (в сироватці крові, серцево-судинній системі), морфологічний стан аорти за дії інгібітору та донору H_2S ; 3) вивчення впливу кальцитріолу на біохімічні зміни в серці та аорті за дієт-індукованого ожиріння (ДІО) за умов модуляції стану системи H_2S /CSE.

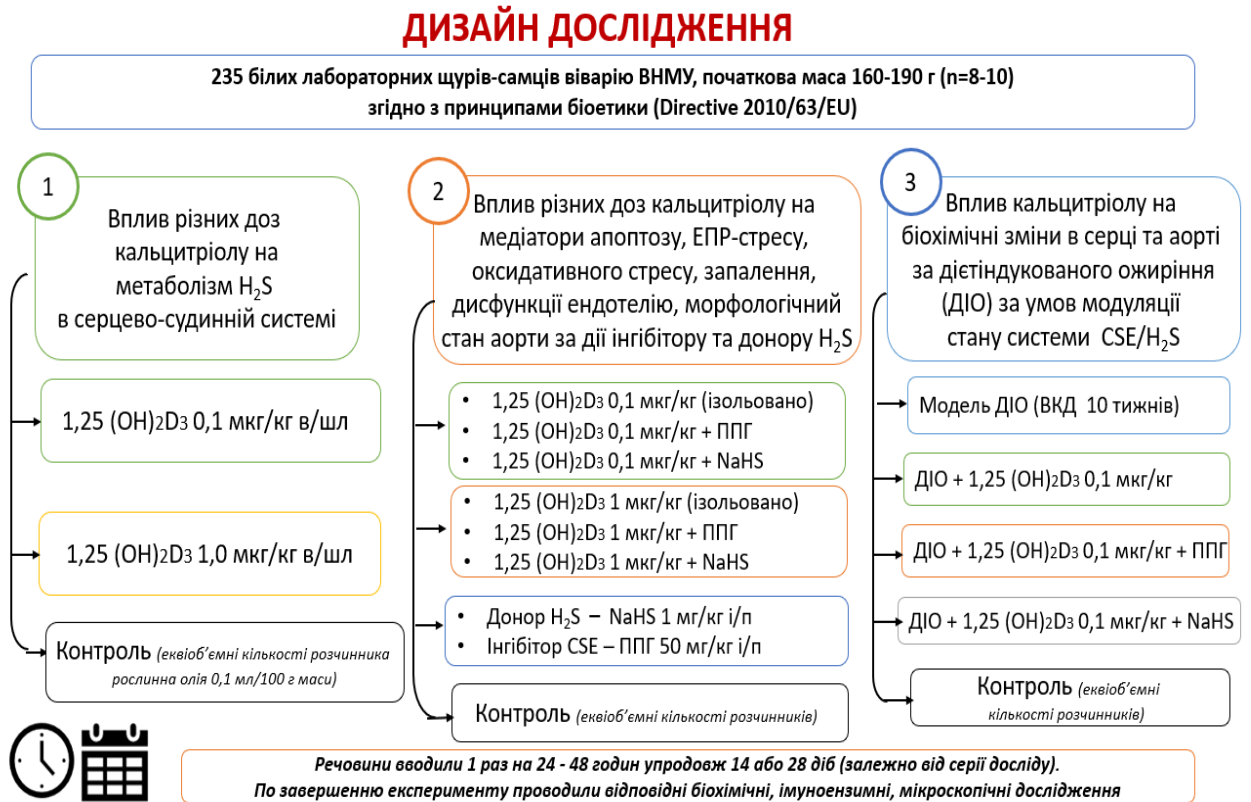


Рис. 2.1. Загальний дизайн експериментального дослідження.

Серія дослідів 1. Дослідження впливу активної форми вітаміну D на метаболізм гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів. У табл. 2.1 наведено розподіл тварин (n=105) на дослідні групи (залежно від термінів та досліджуваних показників). Активну форму вітаміну D – кальцитріол (1,25(OH) $_2$ D $_3$) вводили у дозах 0,1 та 1,0 мкг/кг маси щура (на рафінованій кукурудзяній олії із розрахунку 0,1 мл на 100 г маси щура) внутрішньошлунково (в/шл), за допомогою зонду з оливою. Препарат вводили 1 раз на добу через 48 годин. Тварини групи контролю отримували еквіоб'ємну кількість олії (0,1 мл/100 г маси). Із досліджу тварин груп 1

(контроль), 2 (1,25(OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг), 3 (1,25(OH)₂D₃ 1 мкг/кг) виводили на 14-ту добу, а тварин груп 4 (контроль), 5 (1,25(OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг), 6 (1,25(OH)₂D₃ 1 мкг/кг) – на 28-у добу, відповідно.

Дози кальцитріолу та режим введення були запозичені з літератури [272; 212]. Дозу кальцитріолу 0,1 мкг/кг вважали умовно фізіологічною (терапевтичною), а дозу 1 мкг/кг – високою із режимом введення 1 раз на 48 годин як зазначено [272; 212]. Упродовж усього терміну дослідження загибелі тварин не спостерігалось.

Таблиця 2.1.

Розподіл щурів 1-ої експериментальної серії на групи

Група	Умови дослідження	Показники (серце, аорта)			
		вміст H ₂ S	експресія CSE	активність ензимів обміну H ₂ S	
Тривалість дослідження 14 діб					
1	Контроль	Рослинна олія 0,1 мл/100 г маси в/шл 1 раз на 48 годин	n=5	-	n=10
2	1,25(OH) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг	Кальцитріол 0,1 мкг/кг в/шл на рослинній олії (0,1 мл/100 г маси) 1 раз на 48 годин	n=5	-	n=10
3	1,25(OH) ₂ D ₃ 1,0 мкг/кг	Кальцитріол 1,0 мкг/кг в/шл на рослинній олії (0,1 мл/100 г маси) 1 раз на 48 годин	n=5	-	n=10
Тривалість дослідження 28 діб					
4	Контроль	Рослинна олія 0,1 мл/100 г маси в/шл 1 раз на 48 годин	n=5	n=5	n=10
5	1,25(OH) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг	Кальцитріол 0,1 мкг/кг в/шл на рослинній олії 1 раз на 48 годин	n=5	n=5	n=10
6	1,25(OH) ₂ D ₃ 1,0 мкг/кг	Кальцитріол 1,0 мкг/кг в/шл на рослинній олії 1 раз на 48 годин	n=5	n=5	n=10

В роботі використано препарат Calcitriolo Teva 0,5 mcg (A.I.C.n:035297389, Teva Italia S.r.l.). Упродовж експерименту не спостерігалось загибелі дослідних тварин. Зауважимо, що для чистої субстанції кальцитріолу ($1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Product Number 17936) показник LD50 гострої токсичності у щурів становить 0,62 мг/кг при пероральному введенні [7], що багаторазово перевищує використані нами дози препарату.

Серія дослідів 2. Вплив кальцитріолу на медіатори апоптозу, ЕПР-стресу, оксидативного стресу, запалення в міокарді, дисфункції ендотелію, морфологічний стан аорти за інгібування синтезу H₂S та за введення донору H₂S. У табл. 2.2 наведено розподіл тварин (n=90) на дослідні групи у 2-й серії дослідів. Як і у 1-й серії, кальцитріол ($1,25$ (OH)₂D₃) вводили у дозах 0,1 мкг/кг та 1,0 мкг/кг маси щура в/шл у вигляді масляної суспензії 1 раз на 2 доби упродовж 4-х тижнів. З метою модуляції рівня H₂S в серцево-судинній системі використовували необоротний інгібітор десульфурування L-цистеїну за участі цистатіонін- γ -ліази – пропаргілгліцин (ППГ) в дозі 50 мг/кг маси та неорганічний донор H₂S – натрій гідрогенсульфід (NaHS) у дозі 1 мг/кг маси. Речовини вводили у вигляді свіжовиготовлених водних розчинів внутрішньоочеревинно (в/о) 1 раз на добу. Такі дози та шляхи введення ППГ та NaHS застосовуються в експериментальних дослідженнях на щурах з метою впливу на рівень ендогенного H₂S у різних органах і тканинах [41; 89]. Слід відзначити, що за даними літератури кальцитріол в дозі 0,1 мкг/кг добре поєднувався з антиоксидантом ресвератролом і забезпечував кардіопротекторний, антиішемічний, антиаритмічний ефект у щурів з інфарктом міокарду [212], а також ефективно протидіяв D-галактозоіндукованому старінню міокарда у щурів [78].

В експерименті використано Calcitriolo Teva 0,5 mcg (A.I.C.n:035297389, Teva Italia S.r.l.); D,L-propargylglycine (2-amino-4-pentynoic acid, Sigma-Aldrich, USA), NaHS•H₂O (Sodium hydrosulfide hydrate, Sigma-Aldrich, USA).

Розподіл щурів 2-ої експериментальної серії на групи

Група		Умови досліджу	Показники (серце, аорта)	
			біохімічний аналіз, ІЕА	гістологічне дослідження
1	Контроль	Рослинна олія 0,1 мл/100 г маси в/шл 1 раз на 48 годин	n=10	n=5
2	1,25(OH) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг	Кальцитріол 0,1 мкг/кг в/шл 1 раз на 48 годин	n=10	n=5
3	1,25(OH) ₂ D ₃ 1,0 мкг/кг	Кальцитріол 1,0 мкг/кг в/шл 1 раз на 48 годин	n=10	n=5
4	ППГ	D,L-пропаргілгліцин 50 мг/кг (водний розчин) в/о 1 раз на добу	n=10	n=5
5	1,25(OH) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг +ППГ	Кальцитріол 0,1 мкг/кг в/шл 1 раз на 48 годин, ППГ 50 мг/кг в/о 1 раз на добу	n=10	n=5
6	1,25(OH) ₂ D ₃ 1,0 мкг/кг +ППГ	Кальцитріол 1,0 мкг/кг в/шл 1 раз на 48 годин, ППГ 50 мг/кг в/о 1 раз на добу	n=10	n=5
7	NaHS	Натрій гідрогенсульфід (NaHS) 1 мг/кг (водний розчин) в/о 1 раз на добу	n=10	n=5
8	1,25(OH) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг + NaHS	Кальцитріол 0,1 мкг/кг в/шл 1 раз на 48 годин, NaHS 1 мг/кг в/о 1 раз на добу	n=10	n=5
9	1,25(OH) ₂ D ₃ 1,0 мкг/кг + NaHS	Кальцитріол 1,0 мкг/кг в/шл 1 раз на 48 годин, NaHS 1 мг/кг в/о 1 раз на добу	n=10	n=5

Серія дослідів 3. Вивчення впливу кальцитріолу на біохімічні зміни в серці та аорті за дієт-індукованого ожиріння (ДІО) за умов модуляції стану системи CSE/H₂S. У табл. 2.3 наведено розподіл тварин (n=40) на дослідні групи у 3-й серії дослідів. У 4-х груп щурів (групи 2, 3, 4, 5) викликали дієт-індуковане ожиріння (ДІО) шляхом годування ВКД упродовж 10 тижнів [226; 128]. Як зазначалось вище (див. розділ 2.1), в умовах нашого експерименту енергетична цінність ВКД відповідала 433,8 ккал/ на 100 г корму. Тварини групи контролю отримували стандартну дієту (повнораціонний

гранульований корм) з енергетичною цінністю 271,6 ккал/ 100 г корму. Упродовж останніх 2-х тижнів три дослідні групи (3, 4, 5) отримували 1,25 (ОН)₂D₃ у терапевтичній дозі 0,1 мкг/кг в/шл 1 раз на добу. Для модифікації стану системи H₂S/ CSE щурам групи 4 вводили ППГ (50 мг/кг), у щурам групи 5 – NaHS (1 мг/кг) 1 раз на добу в/о. Контрольні тварини отримували еквіоб'ємні кількості розчинників. В досліді використано Calcitriolo Teva 0,5 mcg (A.I.C.n:035297389, Teva Italia S.r.l.); D,L-propargylglycine (Sigma-Aldrich, USA), NaHS•H₂O (Sigma-Aldrich, USA).

Таблиця 2.3.

Розподіл щурів 3-ої експериментальної серії на групи

Група		Умови досліджу	Біохімічні маркери в серці, аорті, сироватці крові
1	Контроль	Рослинна олія 0,1 мл/100 г маси в/шл 1 раз на добу (9-й та 10-й тиждень)	n=8
2	ДІО	ВКД 10 тижнів	n=8
3	ДІО+1,25 (ОН) ₂ D ₃	ВКД - 10 тижнів. Кальцитріол 0,1 мкг/кг в/шл 1 раз на добу (9-й та 10-й тиждень)	n=8
4	ДІО+1,25 (ОН) ₂ D ₃ + ППГ	ВКД - 10 тижнів. Кальцитріол 0,1 мкг/кг в/шл 1 раз на добу в/шл; ППГ 50 мг/кг 1 раз на добу в/о (9-й та 10-й тиждень)	n=8
5	ДІО+1,25 (ОН) ₂ D ₃ + NaHS	ВКД - 10 тижнів. Кальцитріол 0,1 мкг/кг в/шл 1 раз на добу в/шл; NaHS 1 мг/кг 1 раз на добу в/о (9-й та 10-й тиждень)	n=8

Стан ожиріння визначали за загальноновживаними критеріями [128; 184; 238]: збільшенням маси тіла та *індексу маси тіла (ІМТ, г/см²)* понад 20 % відносно референтних показників здорових тварин аналогічного віку та статі; збільшенням *індексу Лі* (відношення «корінь кубічний маси тіла, г / довжина тіла, см») понад 0,310 ум.од.

2.2. Методи одержання біологічного матеріалу

Біологічний матеріал отримували одразу після евтаназії тварин. Венозну кров збирали у одноразові стерильні пластикові пробірки і після утворення згортка центрифугували при 1500 g протягом 20 хв за кімнатної температури. Отриману сироватку крові відбирали стерильними пластиковими піпетками у мікропробірки типу Еппендорф і зберігали при -20°C до проведення досліджень. У тварин вилучали серце та грудну аорту. Органи промивали охолодженим 1,15 % розчином KCl, відбирали наважки тканин (дл 500 мг). Для подальшого визначення вмісту H_2S наважки тканин обробляли *ex tempore* за методикою Wiliński B. [257]. Тканини гомогенізували у 0,01 М розчині натрій гідроксиду у співвідношення маса/об'єм 1:5 при 3000 об/хв за допомогою гомогенізатора Поттера (тефлон-скло). Відбирали 1 мл гомогенату, додавали 250 мкл 50 % трихлороцтової кислоти, центрифугували 15 хв при 1200 g, відбирали супернатант, який одразу використовували для визначення рівня H_2S . Для біохімічних досліджень наважки міокарду та аорти гомогенізували в охолодженому 1,15 % розчині KCl у співвідношенні маса/об'єм (1:3) при 3000 об/хв (тефлон-скло). Центрифугували 30 хв при 600 g при 4°C , відбирали зразки постядерного супернатанту в пластикові мікропробірки і до виконання досліджень зберігали при -20°C . Для молекулярно-генетичних досліджень проби тканин поміщали у стерильні герметичні пластикові контейнери і зберігали при -70°C . Для гістологічних досліджень одразу після вилучення органи підсушували фільтрувальним папером і фіксували в 10 % розчині формаліну (експозиція не більше 2-х діб перед наступним етапом роботи з матеріалом).

2.3. Методи біохімічних та імуноензимних досліджень

Біохімічні дослідження виконані автором особисто на базі кафедри біохімії ім. професора О.О. Пентюка та НДКДЛ ВНМУ ім. М.І. Пирогова

(свідоцтво про атестацію лабораторії №114/21 від 03.09.2021). Використані у дослідженні засоби вимірювальної техніки пройшли метрологічний контроль.

Біохімічні методи дослідження сульфідного обміну були апробовані під час виконання фрагментів планових НДР кафедри біохімії ім. професора О.О. Пентюка і є добре відтворюваними. *Активність H_2S -синтезуючих ензимів* в реакціях десульфуровування L-цистеїну - цистатіонін- γ -ліази (CSE, КФ 4.4.1.1), цистеїнамінотрансферази (CAT, КФ 2.6.1.3) разом з 3-меркаптопіруват-сульфуртрансферазою (3-MST, КФ 2.8.1.2) визначали у постядерних гомогенатах міокарду та аорти за методом Stipanuk M., Beck P. [236] у модифікації [11]. Активність синтезу H_2S з тіосульфат-аніону за участі тіосульфаттіолсульфуртрансфераз (TST) визначали як описано [11]. У пластикові пробірки вносили 500 мкл відповідного інкубаційного середовища (табл. 2.4), додавали 100 мкл постядерного супернатанту тканин, герметизували пробірки корком (для попередження втрат H_2S), інкубували 60 хв в середовищах «1 та 2», 15 хв в середовищі «3». Для зупинки реакції герметизовані пробірки швидко охолоджували на льоду, утворений H_2S фіксували додаванням 500 мкл 1 % розчину ацетату цинку. Контрольні проби обробляли як дослідні, але матеріал додавали після інкубації середовища.

Таблиця 2.4.

Інкубаційні середовища для визначення ендогенної продукції H_2S

Ензим	Тканина	Інкубаційне середовище (кінцеві концентрації)
CSE (1)	міокард	L-цистеїн 6,0 мМ; ПАЛФ 1,34 мМ; Тріс-НСІ 0,08 М (рН 8,5)
	аорта	L-цистеїн 3,3 мМ; ПАЛФ 0,67 мМ; Тріс-НСІ 0,083 М (рН 8,5)
CAT/ 3-MST (2)	міокард	L-цистеїн 6,0 мМ; α -кетоглутарат 1,6 мМ; ПАЛФ 1,34 мМ; Тріс-НСІ 0,08 М (рН 8,5)
	аорта	L-цистеїн 3,3 мМ; ПАЛФ 0,67 мМ; α -кетоглутарат 825 мМ; Тріс-НСІ 0,083 М (рН 8,5)
TST (3)	міокард, аорта	$Na_2S_2O_3$ 0,2 мМ; дітіотреїтол 2,3 мМ; Тріс-НСІ 0,09 М (рН 8,5)

Вміст H_2S визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності FeCl_3 . В проби додавали 500 мкл 20 мМ розчину N,N-диметил-пара-фенілендіаміну в 7,2 М HCl , 400 мкл 30 мМ розчину FeCl_3 в 1,2 М HCl , інкубували 20 хв при 18-22°C, додавали 1 мл 20 % трихлороцтової кислоти, центрифугували при 1200 g 10 хв. Абсорбцію вимірювали при $\lambda=670$ нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 1,0 см (Arel PD-303, Saitama, Japan). Вміст H_2S розраховували за калібрувальним графіком. Стандартом слугували водні розчини $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ з концентрацією 31,2-3120 мкМ. Усі дослідження проводили в дублях. H_2S -синтезуюча активність була розрахована за

$$A = \frac{E2 - E1}{k \cdot t \cdot P}$$

формулою, де A – активність ензиму у нмоль H_2S /хв·мг протеїну; $E2$ – екстинція дослідної проби; $E1$ – екстинція контрольної проби; k – калібрувальний коефіцієнт; t – час інкубації; P – кількість протеїну в пробі, мг.

Визначення активності ензимів, які беруть участь в шляхах утилізації гідроген сульфїду. Активність тіоредоксинредуктази (TrxR, КФ 1.8.1.9) визначали за швидкістю NADPH-залежного відновлення 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоату) [124]. Інкубаційне середовище містило 0,25 М Трис- HCl (рН 7,4), 1 мМ ЕДТА, 1 мМ 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоату), 0,25 мМ NADPH. Реакцію ініціювали додаванням 50 мкл постядерного гомогенату до 1 мл інкубаційного середовища, реєстрували підвищення абсорбції через 15 хв при 25°C та $\lambda=412$ нм, вимірювання проводили проти бланк-реагенту. Активність тіоредоксинредуктази розраховували за наступною формулою

$$A = \frac{E2 - E1}{k \cdot t \cdot P}$$

, де A – активність ензиму у нмоль DTNB /хв·мг протеїну; DTNB - 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоат); $E1$ – екстинція проби до інкубації; $E2$ – екстинція проби в кінці інкубації; k – калібрувальний коефіцієнт; t – час інкубації; P – кількість протеїну в пробі, мг.

Активність сульфїтооксидази (SO, КФ 1.8.3.1) визначали за швидкістю відновлення гексоціаноферату калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) в присутності сульфїт-аніону за методом Cohen [67]. В кювету вносили 2,5 мл інкубаційного середовища, що містило 0,4 мМ Na_2SO_4 , 0,4 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,1 мМ ЕДТА,

0,10 М Трис-НСl (рН 8,5). Реакцію ініціювали додаванням 50 мкл постядерного гомогенату. Швидкість відновлення гексоціаноферату реєстрували за зниженням абсорбції протягом 5 хв при 25°C при довжині хвилі 420 нм (молярний коефіцієнт екстинції $1,02 \cdot 10^{-3}$ при $\lambda=420$ нм). Активність ензиму розраховували за формулою

$$A = \frac{E_0 - E}{\varepsilon \cdot t \cdot P}$$
, де A – активність ензиму у нмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ /хв·мг протеїну; E – кінцева екстинція проби; E_0 – початкова екстинція проби; ε – молярний коефіцієнт екстинції; t – час інкубації; P – кількість протеїну, мг.

Вміст гідроген сульфїду в постядерному супернатанті гомогенатів міокарду та аорти визначали спектрофотометричним методом як описано [257]. До 750 мкл супернатанту додавали 150 мкл 20 мМ розчину N,N-диметил-пара-фенїлендіамїну сульфату в 7,2 М НСl, 150 мкл 30 мМ розчину FeCl₃ в 1,2 М НСl, інкубували 20 хв при 20-22°C. Фотометрували при $\lambda=670$ нм (ApeI PD-303, Saitama, Japan). Вміст S²⁻ (H₂S) в пробі розраховували за калїбрувальним графіком. Стандартом слугували водні розчини Na₂S·9H₂O (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) з концентрацією 31,2-3120 мкМ, графік поглинання будували при $\lambda=670$ нм. Усі дослідження проводили в дублях.

Маркери оксидативного стресу в гомогенатах тканин визначали відомими спектрофотометричними методами. Вміст малонового діальдегїду (МДА) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [175], карбонільних груп - за реакцією з 2,4-динїтрофенїлгідразином [93].

Імуноензимний аналіз. Для оцінки кардіопротекторної дії 1,25 (ОН)₂D₃ визначали рівні ключових медіаторів запалення, апоптозу, маркери оксидативного стресу в міокарді. Рівні фактору некрозу пухлин альфа (TNF α), білків теплового шоку (HSP60, HSP70), каспази-3 визначали методом ELISA для розчинних протеїнів [75] із використанням комерційних наборів моноклональних (первинних) антитїл класу IgG до досліджуваних протеїнів та поліклональних (вторинних) антитїл, кон'югованих з пероксидазою хрону (Santa Cruz Biotechnology, USA) та субстрату для пероксидази хрону – о-

фенілендіаміну (Sigma-Aldrich, USA). Дослідження проводили у 96-лункових мікропланшетах з сорбційною здатністю для розчинних протеїнів. Постядерний супернатант міокарду розводили 50 мМ Тріс-НСІ буфером (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl, до концентрації протеїну 10 мкг/мл. В лунки мікропланшету вносили 100 мкл зразків, закривали адгезивною плівкою, інкубували при 4°C упродовж 12 годин. Лунки відмивали від незв'язаного матеріалу буферним розчином (50 мМ Тріс-НСІ буфер (рН 7,4) з 150 мМ NaCl та 0,05 % Твін-20). Для блокування неспецифічних місць зв'язування в лунки додавали 100 мкл 5 % розчину знежиреного молока і інкубували 60 хв при 37°C. Лунки промивали буферним розчином і вносили 50 мкл первинних антитіл для утворення на твердій фазі комплексу антиген-антитіло, інкубували 60 хв при 37°C. Лунки відмивали від незв'язаних реагентів і вносили 50 мкл ензимного кон'югату вторинних антитіл з пероксидазою хрому інкубували 60 хв при 37°C. Лунки промивали і вносили 100 мкл хромогенного субстрату - розчину орто-фенілендіаміну в концентрації 0,4 мг/мл, приготованому на цитратному буфері (рН 5,0) з вмістом 0,013 % H₂O₂. Інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Пероксидазну реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 1М H₂SO₄. Абсорбцію вимірювали при $\lambda=492$ нм проти бланк-реагенту. Вміст досліджуваних маркерів виражали в ум.од. / мг протеїну.

Вміст протеїну у зразках визначали за методом Бредфорд [54]. У пробірку вносили 50 мкл зразку, додавали 500 мкл стандартного реактиву за Бредфорд, повільно струшували, інкубували 10 хв при кімнатній температурі, оптичну щільність визначали при $\lambda=595$ нм.

Для оцінки стану ендотелію судин визначали сироватковий рівень ендотеліну-1 методом ELISA за комерційним набором «Endothelin (1-21)» (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co. KG, Vienna, Austria, Cat. No. BI-20052) відповідно до інструкції виробника. Для побудови калібрувальної кривої були використані стандартні розчини ендотеліну-1 у наступних концентраціях - 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 фмоль/мл. Чутливість набору - 0,02 фмоль/мл, коефіцієнт варіації ≤ 10 %. Абсорбцію вимірювали при $\lambda=450$ нм

(диференційний фільтр $\lambda=630$ нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS (USA). Також за умов ожиріння оцінювали сироватковий рівень проатерогенного, прозапального адипокіну, що також асоціюється з ендотеліальною дисфункцією – вісфатину за комерційним набором «RayBio Rat Visfatin Enzyme Immunoassay Kit» (RayBiotech, USA). Для побудови калібрувальної кривої були використані стандартні розчини вісфатину у концентраціях 0; 0,1; 1; 10; 100; 1000 нг/мл. Чутливість набору – 0,778 нг/мл, коефіцієнт варіації $\leq 10\%$. Абсорбцію вимірювали при $\lambda=450$ нм (диференційний фільтр $\lambda=630$ нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS (USA).

Кваліфікація реактивів: L-цистеїн, $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, дітіотреїтол, реактив Елмана (DTNB) та NADPH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA); α -кетоглутарат, піридоксальфосфат, N,N-диметил-пара-фенілендіамін сульфат (Fluka, Німеччина). Інші реактиви були вітчизняного виробництва категорії х.ч.

2.4. Дослідження експресії гена цистатіонін- γ -ліази (CSE)

Дослідження виконані в навчально-науковій клініко-діагностичній лабораторії ПЛР ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про атестацію №051/15) за допомогою завідувачки, наукового співробітника Людкевич Г.П. Рівень експресії гена цистатіонін- γ -ліази (CSE) визначали методом кількісної полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального часу (qRT-PCR) [110]. Виділення загальної РНК з тканин виконували за допомогою комерційного комплексу реагентів «Quick-RNA MicroPrep Kit» («Zymo Research», США); кДНК отримували за допомогою комерційного набору для проведення реакції зворотної транскрипції «ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit» («New England BioLabs», США). Реакційна суміш для проведення реакції зворотної транскрипції включала 2 мкл праймермікс (60 мкМ оліго(dT)₂₃), 2 мкл (50 од/мкл) оберненої транскриптази M-MuLV-Reaction Mix, 8 мкл деіонізуючої води, вільної від РНКаз. До 10 мкл суміші

додавали 2 мкг загальної РНК. Експресію гена *CSE* визначали в присутності барвника SYBR Green I за допомогою детектувального ампліфікатора CFX 96 (Bio Rad, USA). Реакційна суміш містила 10 x буфер для ампліфікації з барвником SYBR Green I; 25 мМ MgCl₂; 2,5 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів; специфічні праймери цільових генів (*CSE*) та референтного гену β-актину (*Actb*), 5 Од/мкл SynTaq ДНК-полімерази. До суміші додавали 5 мкл зразка кДНК.

Для проведення реакції були використані наступні пари праймерів:

1) *CSE*: *F* (прямий): 5'-GCTGAGAGCCTGGGAGGATA-3';

R (зворотний): 5'-TCACTGATCCCGAGGGTAGCT-3';

2) *Actb*: *F* (прямий): 5'-ACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3';

R (зворотний) 5'-TATCGTCATCCATGGCGAACT-3'.

Застосовували наступний режим ампліфікації: 94°C, 3 хвилини (преденатурація); 40 циклів: 94°C - 15 секунд (денатурація); 64°C - 40 секунд (відпал); 72 °C - 30 секунд (елонгація). Для контролю специфічності реакції димеризації праймерів в кінці кожного циклу ампліфікації реєстрували флуоресценцію неспецифічного інтеркалюючого барвника SYBR-Green з побудовою кривої плавлення. Для перевірки відтворюваності результатів qRT-PCR аналіз повторювали тричі з кожним дослідним зразком. Кількість мРНК цільового гену обчислювали за допомогою відносного методу Ct (ΔΔCt Method) з розрахунком за формулою $2^{-\Delta Ct}$ [209]. Результати нормалізували до мРНК референтного гена β-актину; відносний рівень мРНК *CSE* (цільовий ген) / *Actb* виражали в умовних одиницях.

2.5. Морфологічні дослідження

Морфологічні дослідження виконані у Вінницькому обласному патолого-анатомічному бюро (ліцензія МОЗ України АЕ №638623 від 23.04.2015, №240). Після евтаназії у тварин вилучали грудну аорту, фіксували 10 % розчином нейтрального формаліну для стабілізації клітин та тканин

(тривалість експозиції - 24 - 48 годин). Стабілізовані формаліном зразки тканин проводили через батарею спиртів зростаючої концентрації (з метою дегідратації) і заливали в парафінові блоки. Далі готували напівтонкі зрізи із товщиною 5-7 мкм за допомогою санного мікротома Мікромед МС-2М. Препарати забарвлювали гематоксиліном та еозином і далі досліджували методом світлової мікроскопії при збільшенні в 400 разів за допомогою мікроскопу «Olympus BX-41» (об'єктив x 40; окуляр x 10). Мікрофотографії виготовляли за допомогою фотокамери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія) і відповідного програмного забезпечення.

Для визначення *індексу жирової маси (Adiposity index)* вилучали мезентеріальний, ретроперитонеальний та епідидимальний жир, підсушували фільтрувальним папером, зважували на аналітичних вагах. Індекс *жирової маси* розраховували як відношення сумарної маси вилученого жиру (г) до фінальної маси тіла (г) [145].

2.6. Статистичні методи обробки експериментальних даних

В роботі були використані загально прийняті для біологічних та медичних досліджень методи статистичної обробки експериментальних даних за допомогою універсальних програм MS Excel 2010, IBM Statistics SPSS 26 for Windows. Вибірки даних перевіряли щодо нормальності розподілу за критерієм Шапіро-Уїлка (W). Для кількісних показників обчислювали середнє значення (M), стандартне відхилення (σ), похибку середнього (m). Міжгрупові відмінності оцінювали за допомогою t-критерія Стьюдента (за умов нормального розподілу даних) та за допомогою критерія U Мана-Уїтні (при відхиленні від нормального розподілу). Для оцінки можливих асоціативних зв'язків між показниками застосовували кореляційний аналіз за методами Пірсона або Спірмана (залежно від нормальності розподілу даних). За величиною коефіцієнта кореляції оцінювали глибину зв'язку (з урахуванням статистичної значущості): $r < 0,3$ – слабкий зв'язок, $0,3-0,5$ – помірний зв'язок,

0,5-0,7 – значний зв’язок, $> 0,7$ – сильний зв’язок. Відмінності при рівні значущості $p < 0,05$ вважали достовірними, а при рівні значущості $p < 0,001$ – високодостовірними. Результати наведено як $M \pm m$, для окремих показників – як медіана (Me) та інтерквартильний інтервал [IQR].

Резюме. Застосовані в роботі методи експериментального дослідження є апробованими, відтворюваними, сучасними, а кількість спостережень є достатньою для отримання статистично значущих результатів, що в цілому дозволяє об’єктивно і комплексно вирішити задачі наукового дослідження і встановити роль активної форми вітаміну D у регуляції метаболізму гідроген сульфїду та механізмах H_2S -залежної кардіопротекції.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [22, 10, 49, 278, 11, 9, 6, 27].

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ КАЛЬЦИТРІОЛУ НА МЕТАБОЛІЗМ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ

В серцево-судинній системі гідроген сульфід (H_2S) утворюється переважно цистатіонін- γ -ліазою (CSE) та цистеїнаміно-трансферазою/3-меркаптопіруватсульфуртрасферазою (CAT/3-MST) з L-цистеїну в присутності ПАЛФ (див. розділ 1.). Пул H_2S в серці та судинах може поповнюватись й шляхом відновлення аніону $S_2O_3^{2-}$ за допомогою тіосульфатсульфурттрансфераз (TST) та тіолових відновників (GSH, тіоредоксину, дигідроліпоату) [160; 135; 152]. В сульфідному обміні важливу роль відіграють тіоредоксинредуктаза та сульфітооксидаза, які залучені до депонування та утилізації H_2S у мітохондріях [160; 135]. В окремих дослідженнях засвідчено, що вітамін D безпосередньо дотичний до регуляції обміну сірковмісних амінокислот та їх біологічно-активних метаболітів в організмі тварин та людини. Наприклад, відмічено здатність вітаміну D регулювати синтез GSH [115; 100], стимулювати утилізацію гомоцистеїну в міокарді [237], підвищувати рівень H_2S в тканинах [258]. Таким чином, подальші дослідження впливу вітаміну D на різні ланки сульфідного обміну в серцево-судинній системі тварин в нормі та різних патологічних станів є доцільним.

Завданнями даного розділу роботи було: 1) з'ясувати вплив активної форми вітаміну D - кальцитріолу ($1,25(OH)_2D_3$) у дозах 0,1 мкг/кг (умовно фізіологічній [212; 78]) та 1 мкг/кг (високій) на показники метаболізму H_2S в серці та грудній аорті здорових статевозрілих щурів; 2) дослідити вплив кальцитріолу ($1,25(OH)_2D_3$) у дозах 0,1 та 1 мкг/кг на рівень експресії гена *CSE* в серці та грудній аорті щурів.

3.1. Вплив кальцитріолу на рівень H_2S в серцево-судинній системі щурів

Спочатку ми дослідили вплив кальцитріолу у дозі 0,1 мкг/кг та 1,0 мкг/кг на рівень H_2S в міокарді здорових статевозрілих щурів-самців станом на 14-ту та 28-му добу експерименту. Відзначимо, що вміст H_2S в міокарді тварин контрольних груп коливався в діапазоні 2,06-3,16 нмоль/мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 2,51 та IQR [2,41; 2,95] нмоль/мг протеїну. Групи контролю (14-та та 28-ма доба) були репрезентативними за рівнем H_2S ($2,62 \pm 0,13$ та $2,61 \pm 0,25$ нмоль/мг протеїну, $p > 0,5$). Введення кальцитріолу викликало достовірні зміни рівня H_2S в міокарді щурів, спрямованість та виразність яких залежала від дози гормону та тривалості його застосування (рис. 3.1.).

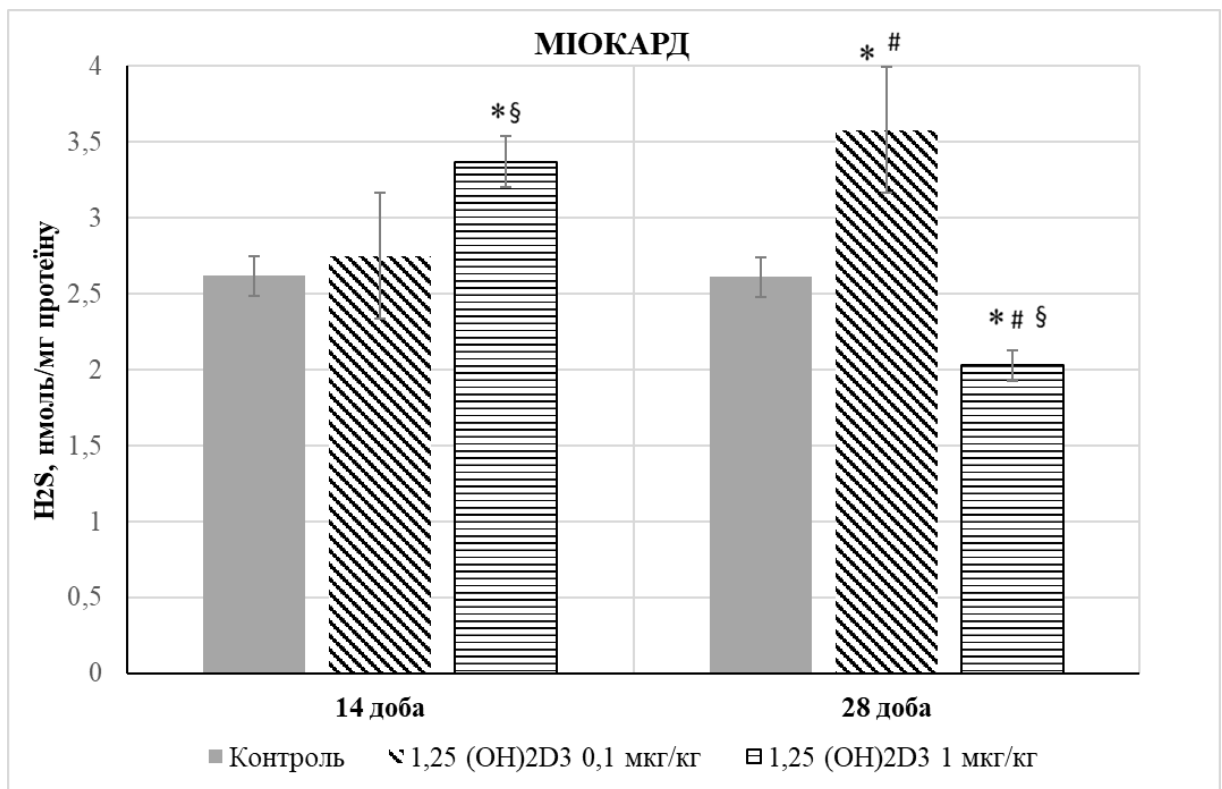


Рис. 3.1. Вплив кальцитріолу на рівень H_2S в міокарді щурів ($M \pm m$; $n=5$). Примітки: 1. * $p < 0,05$ – відносно групи контролю; 2. # $p < 0,05$ - відносно стану на 14 добу у відповідній групі; 3. § $p < 0,05$ – відносно групи «1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг».

Слід відзначити, що на 14-ту добу у щурів, які отримували 1,25 (ОН)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг, не спостерігалось суттєвих змін рівня H₂S в міокарді, який становив 2,75±0,25 нмоль/мг протеїну (p > 0,5 порівняно з контролем). Однак, введення 1,25 (ОН)₂D₃ у дозі 1 мкг/кг викликало достовірне зростання рівня H₂S на 14-ту добу – до 3,37±0,14 нмоль/мг протеїну, що було вищим на 28,6 % (p<0,05) порівняно з контролем.

На 28-му добу у щурів, які отримували 1,25 (ОН)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг, спостерігалось статистично значуще підвищення вмісту H₂S у міокарді: на 37,1 % (p<0,01) відносно контролю і на 30,2 % (p<0,05) відносно стану на 14-ту добу, відповідно. У щурів, що отримували 1,25 (ОН)₂D₃ у дозі 1 мкг/кг, на 28-му добу реєструвалось зниження рівня H₂S в міокарді (до 2,03±0,10 нмоль/мг протеїну), що було нижчим на 39,8 % (p<0,05) відносно стану на 14-ту добу.

Дослідження впливу кальцитріолу на рівень H₂S в аорті засвідчило аналогічні закономірності (рис. 3.2.). Вміст H₂S в аорті щурів контрольних груп коливався в межах 1,73-2,20 нмоль/мг протеїну (95 % ДІ) і становив в групах контролю 1,93±0,09 та 2,04±0,06 нмоль/мг протеїну станом на 14-ту та 28-у добу, відповідно (p>0,5). Введення 1,25 (ОН)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг викликало помірне підвищення аортального рівня H₂S на 14-ту добу (до 2,29±0,14 нмоль/мг протеїну), що на 18,6 % (p<0,05) перевищувало показник групи контролю. У щурів, що отримували 1,25 (ОН)₂D₃ у дозі 1 мкг/кг, на 14-ту добу спостерігалось більш виразне зростання рівня H₂S в аорті до 3,09±0,23 нмоль/мг протеїну, що було вищим за контроль в 1,6 рази (p<0,01).

На 28-му добу досліду у щурів, які отримували 1,25 (ОН)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг, рівень H₂S в аорті становив 2,95±0,25 нмоль/мг протеїну, що на 28,8 % (p<0,05) перевищував показник станом на 14-ту добу. Натомість, у щурів, що отримували 1,25 (ОН)₂D₃ у дозі 1 мкг/кг, на 28-му добу реєструвалось зниження рівня H₂S в аорті (до 1,32±0,10 нмоль/мг протеїну), що було нижчим

на 35,3 % відносно контролю ($p < 0,05$) і в 1,6 рази нижче порівняно зі станом на 14-ту добу ($p < 0,05$).

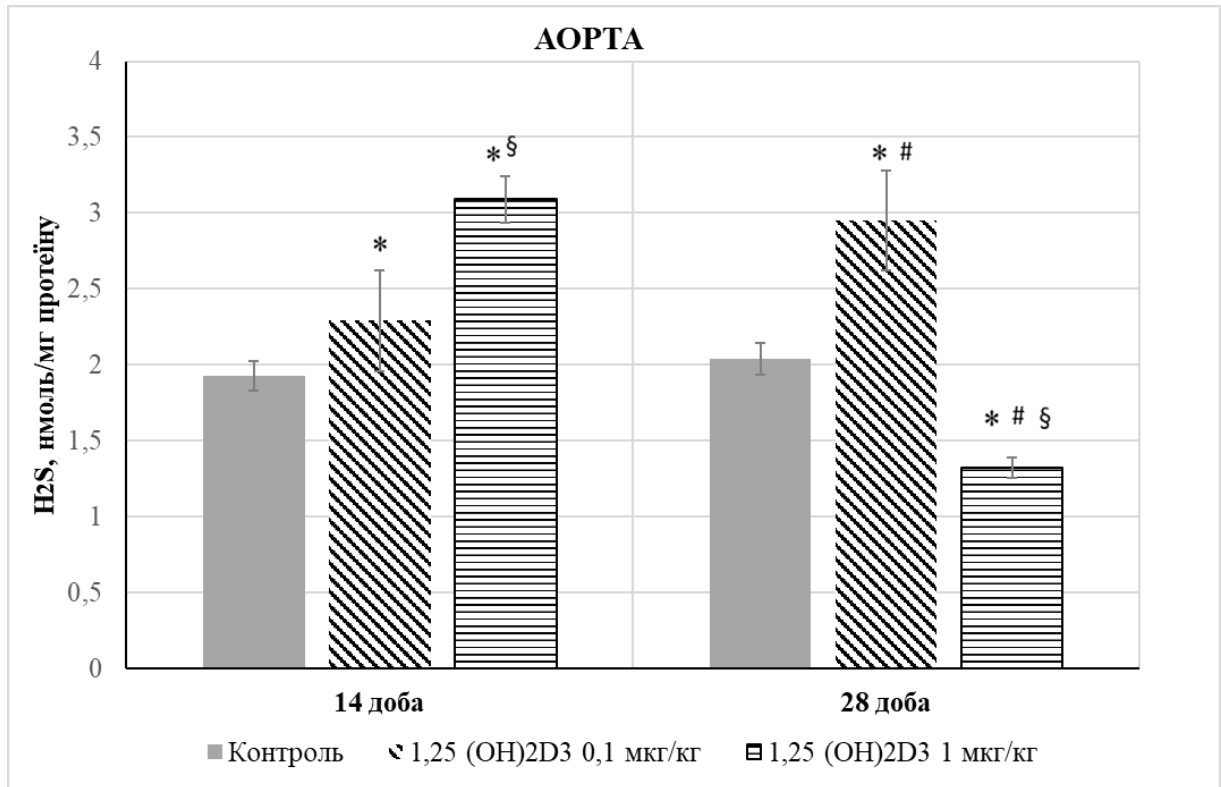


Рис. 3.2. Вплив кальцитріолу на рівень H₂S в аорті щурів (M±m; n=5). Примітки: 1. * $p < 0,05$ – відносно групи контролю; 2. # $p < 0,05$ - відносно стану на 14 добу у відповідній групі; 3. § $p < 0,05$ – відносно групи «1,25 (ОН)₂D₃ 0,1 мкг/кг».

Отже, кальцитріол у фізіологічній дозі забезпечував стійке помірне зростання рівня H₂S в аорті щурів на 14-ту добу і цей ефект помітно посилювався на 28-му добу. Порівняно з аортою, у міокарді зростання рівня H₂S при застосуванні фізіологічної дози кальцитріолу виникало пізніше і зміни набували достовірності лише на 28-му добу.

Кальцитріол у високій дозі (1 мкг/кг) забезпечував достовірне підвищення рівня H₂S в аорті і міокарді при нетривалому застосуванні (протягом 14 діб), але в наступному спричиняв формування дефіциту H₂S в серцево-судинній системі щурів. На наступному етапі було досліджено вплив різних доз кальцитріолу на активність ензимів сульфідного обміну в серцево-судинній системі.

3.2. Вплив кальцитріолу на ензиматичне утворення H_2S в шляхах десульфурування L-цистеїну та експресію гена *CSE* в міокарді та аорті щурів

Спочатку ми дослідити активність ензимів, що забезпечують утворення H_2S з L-цистеїну в серцево-судинній системі. В умовах нашого експерименту активність CSE в міокарді тварин контрольних груп коливалась в межах 0,55-1,23 нмоль H_2S / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 0,71 та IQR [0,63; 0,83], відповідно. В аорті активність CSE коливалась в діапазоні 0,72-1,60 нмоль H_2S / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 1,01 та IQR [0,85; 1,13], відповідно. Групи контролю (14 та 28 доба) були репрезентативними за активністю CSE в серці та аорті щурів (табл. 3.1).

Встановлено, що станом на 14-ту добу введення $1,25 (OH)_2D_3$ у дозі 0,1 мкг/кг викликало слабку тенденцію до підвищення активності CSE ($p=0,143$, тест Мана-Уїтні) в міокарді і забезпечило статистично значуще підвищення активності CSE на 42,7 % ($p<0,05$) в аорті. Стимулюючий вплив кальцитріолу у дозі 0,1 мкг/кг щодо CSE спостерігався і в подальшому. Так, станом на 28 добу в групі « $1,25 (OH)_2D_3$ 0,1 мкг/кг» активність CSE в міокарді та аорті зросла на 38,1 та 43,9 % ($p<0,05$), відповідно.

Введення високої дози кальцитріолу викликало статистично значуще підвищення активності CSE в міокарді та аорті станом на 14-ту добу (на 71,2 та 58,2 %, порівняно з контролем). Однак, станом на 28-му добу у щурів, що отримували $1,25 (OH)_2D_3$ в дозі 1 мкг/кг, реєструвалось статистично значуще зниження активності CSE в міокарді - на 30,2 % ($p<0,05$) порівняно з групою контролю і на 49,5 % ($p<0,01$) порівняно зі станом на 14-ту добу. Депримуючий вплив тривалого застосування високої дози кальцитріолу на CSE-залежну продукцію H_2S реєструвався і в аорті. Так, станом на 28-му добу в групі « $1,25 (OH)_2D_3$ 1 мкг/кг» аортальна активність CSE була на 33,6 % ($p<0,01$) нижче, ніж в контролі, і на 53,9 % ($p<0,001$) нижче порівняно зі станом на 14-ту добу, відповідно.

Вплив кальцитріолу на активність цистатіонін- γ -ліази (CSE) в міокарді та аорті щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу / група		Активність CSE, нмоль H_2S / хв·мг протеїну			p-value
		Контроль	1,25 (OH) $_2D_3$ 0,1 мкг/кг	1,25 (OH) $_2D_3$ 1 мкг/кг	
		1	2	3	
Міокард	14 доба	0,73 \pm 0,07	0,89 \pm 0,09	1,25 \pm 0,08	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,01$ $p_{2,3}<0,05$
	28 доба	0,76 \pm 0,06	1,05 \pm 0,10	0,53 \pm 0,07	$p_{1,2}<0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,01$
Аорта	14 доба	1,03 \pm 0,08	1,47 \pm 0,13	1,63 \pm 0,18	$p_{1,2}<0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}>0,05$
	28 доба	1,07 \pm 0,10	1,54 \pm 0,14	0,71 \pm 0,02	$p_{1,2}<0,05$ $p_{1,3}<0,01$ $p_{2,3}<0,001$

Дослідження активності шляху CAT/3-MST за умов введення кальцитріолу також засвідчило достовірні зміни в метаболізмі H_2S в серцево-судинній системі щурів (табл. 3.2). Зауважимо, що в міокарді тварин груп контролю активність CAT/3-MST знаходилась в межах 0,75-1,48 нмоль H_2S / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 1,06 та IQR [0,83; 1,24], відповідно. В аорті активність CAT/3-MST була дещо нижчою і знаходилась в діапазоні 0,32-0,89 нмоль H_2S / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 0,60 та IQR [0,36; 0,76], відповідно. За показниками активності шляху CAT/3-MST контрольні групи (14-та та 28-ма доба) були репрезентативними.

Встановлено, що кальцитріол у фізіологічній дозі справляв помірний стимулюючий вплив на аортальну та міокардіальну активність шляху CAT/3-MST. Так, станом на 14-ту добу введення 1,25 (OH) $_2D_3$ у дозі 0,1 мкг/кг викликало тенденцію до зростання міокардіальної активності CAT/3-MST і спричинило достовірне підвищення на активності CAT/3-MST в аорті на

39,3 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Також станом на 28-му добу в групі «1,25 (ОН)₂D₃ 0,1 мкг/кг» було зареєстровано статистично значуще підвищення активності САТ/3-MST в міокарді (на 29,3 %, $p < 0,05$) і ще більш виразне зростання цього показника в аорті (на 44,4 %, $p < 0,05$) порівняно з контролем. Застосування кальцитріолу в дозі 1 мкг/кг викликало достовірне підвищення активності САТ/3-MST на 14-ту добу в міокарді (на 45,1 %, $p < 0,01$) і значно більш виразне підвищення цього показника в аорті (на 88,5 %, $p < 0,01$) порівняно з контролем. На 28-му добу дослідження в групі «1,25 (ОН)₂D₃ 1 мкг/кг» також реєструвалась більш висока активність САТ/3-MST в міокарді та аорті (на 25,6 та 33,3 %, $p < 0,05$) порівняно з контролем, але ці зміни були меншими порівняно зі змінами цього показника на 14-ту добу. Таким чином, кальцитріол викликав помірну стимуляцію шляху САТ/3-MST в серці та судинах щурів, при цьому ефект фізіологічної дози цього гормону був більш сприятливим, ніж високої дози.

Таблиця 3.2.

Вплив кальцитріолу на активність цистеїнамінотрансферази /
3-меркаптосульфуртрансферази в міокарді та аорті щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Умови дослідження / Група		Активність САТ/3-MST, нмоль Н ₂ S /хв на 1 мг протеїну			p-value
		Контроль	1,25 (ОН) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг	1,25 (ОН) ₂ D ₃ 1 мкг/кг	
		1	2	3	
Міокард	14 доба	1,04±0,08	1,18±0,09	1,51±0,35	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} < 0,01$ $p_{2,3} < 0,05$
	28 доба	1,09±0,07	1,41±0,12	1,37±0,09	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} > 0,05$
Аорта	14 доба	0,61±0,08	0,85±0,07	1,15±0,11	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} < 0,01$ $p_{2,3} < 0,05$
	28 доба	0,54±0,06	0,78±0,10	0,72±0,07	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} > 0,05$

Для оцінки виразності змін у шляхах утворення H_2S з L-цистеїну під впливом кальцитріолу ми оцінили коефіцієнт CSE / CAT в міокарді та аорті. В умовах нашого досліджу коефіцієнт CSE / CAT у тварин груп контролю в міокарді коливався у діапазоні 0,44-0,98 ум.од. (95 % ДІ) із медіаною 0,74 та IQR [0,58; 0,83] ум.од., відповідно. В аорті коефіцієнт CSE / CAT знаходився у межах 0,88-2,88 ум.од. (95 % ДІ) із медіаною 1,88 та IQR [1,33; 2,63] ум.од., відповідно. Отже, у здорових тварин коефіцієнт CSE / CAT в аорті виявився вищим, ніж в міокарді, що може свідчити про превалювання CSE-залежного утворення H_2S в судинах і CAT/3-MST-залежного утворення H_2S в міокарді. Зауважимо, що контрольні групи (14-та та 28-ма доба) не відрізнялись за середніми значеннями цього показника в міокарді та аорті (табл. 3.3). Виявилось, що короткотривале застосування кальцитріолу у дозі 0,1 мкг/кг не викликало змін коефіцієнту CSE / CAT станом на 14-ту та 28-добу досліджу, що свідчить про збереження нормального балансу у цитозольних та мітохондріальних шляхах утворення H_2S з L-цистеїну.

Таблиця 3.3.

Вплив кальцитріолу на коефіцієнт CSE / CAT в міокарді та аорті щурів
($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу / Група		Коефіцієнт CSE / CAT, ум.од.			p-value
		Контроль	1,25 (OH) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг	1,25 (OH) ₂ D ₃ 1 мкг/кг	
		1	2	3	
Міокард	14 доба	0,73±0,07	0,78±0,07	0,85±0,07	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}>0,05$ $p_{2,3}>0,05$
	28 доба	0,71±0,04	0,77±0,07	0,41±0,08	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,01$ $p_{2,3}<0,01$
Аорта	14 доба	2,13±0,44	1,79±0,17	1,50±0,17	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}>0,05$ $p_{2,3}>0,05$
	28 доба	2,16±0,23	2,24±0,32	1,09±0,22	$p_{1,2}>0,05$ $p_{1,3}<0,05$ $p_{2,3}<0,05$

Застосування кальцитріолу у дозі 1 мкг/кг також не викликало статистично значущих змін коефіцієнту CSE / CAT в міокарді та аорті станом на 14-ту добу. Проте, на 28-му добу в групі «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг» спостерігалось статистично значуще зниження коефіцієнту CSE / CAT в міокарді на 42,3 % (p<0,05) і в аорті – на 49,5 % (p<0,05) порівняно з відповідним контролем. Такі зміни можуть свідчити про більш значний депримуєчий ефект високих доз кальцитріолу на CSE-залежне продукування H₂S порівняно з його утворенням за участі CAT/3-MST в серці та аорті щурів.

Вплив кальцитріолу на продукування H₂S може реалізуватись через різні механізми, у тому числі через регуляцію експресії ензимів сульфідного обміну. Тому на наступному етапі ми дослідили вплив різних доз 1,25 (OH)₂D₃ на рівень експресії гена CSE в міокарді та аорті щурів станом на 28-му добу. Адже саме у цей термін виявлялись найбільш суттєві відмінності щодо впливу фізіологічної та високої доз кальцитріолу на сульфідний метаболізм.

Результати наших досліджень показали, що кальцитріол у фізіологічній та високій дозі викликає різновекторні зміни рівня експресії гена CSE в серцево-судинній системі щурів (рис. 3.3.). Так, введення 1,25 (OH)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг викликало підвищення відносного рівня мРНК CSE / Actb в міокарді на 34,2 % (p<0,01), а в аорті – на 38,8 % (p<0,01) порівняно з контролем станом на 28-му добу. Натомість, застосування 1,25 (OH)₂D₃ в дозі 1 мкг/кг викликало пригнічення експресії гена CSE і відносний рівень мРНК CSE / Actb в міокарді виявився нижчим на 37,2 % (p<0,01), а в аорті – нижчим на 32,6 % (p<0,01), відповідно, порівняно з групою контролю. Зазначені зміни експресії гена CSE за дії різних доз кальцитріолу узгоджується зі змінами десульфуразної активності цистатіонін-γ-ліази станом на 28-добу як у міокарді, так і в аорті щурів.

Отже, кальцитріол залучений до регуляції біосинтезу H₂S на рівні експресії гена CSE в аорті та міокарді щурів із стимулюючим ефектом у фізіологічній дозі та інгібуючим ефектом у високій дозі.

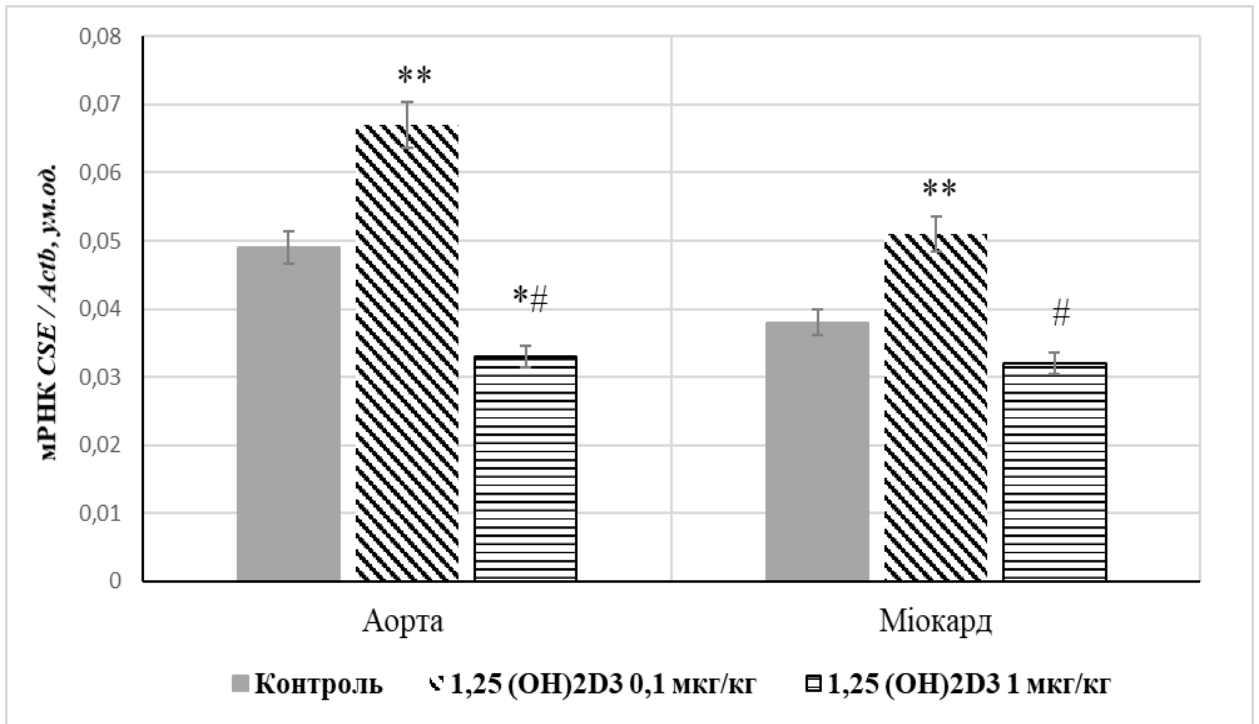


Рис. 3.3. Вплив кальцитриолу на експресію гена *CSE* в аорті та міокарді щурів ($M \pm m$; $n=5$). Примітки: 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – відносно групи контролю; 2. # $p < 0,01$ - відносно групи 1,25(ОН)D₃ 0,1 мкг/кг.

На наступному етапі ми дослідили вплив кальцитриолу на активність мітохондріальних ензимів сульфідного обміну в серцево-судинній системі щурів.

3.3. Вплив кальцитриолу на активність ензимів мітохондріальних шляхів метаболізму H₂S в міокарді та аорті щурів

Результати наших досліджень засвідчили статистично значущі зміни тіосульфатсульфуртрансферазної (TST) активності в міокарді та аорті за дії кальцитриолу (табл. 3.4). В контрольних групах активність TST відповідала діапазону 0,94-1,96 нмоль H₂S / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 1,24 та IQR [1,08; 1,45], відповідно. В аорті активність TST була вищою порівняно із міокардом і знаходилась в діапазоні 1,16-2,76 нмоль H₂S / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 1,59 та IQR [1,41; 1,85], відповідно. Контрольні групи (14-та та 28-ма доба) були репрезентативними за активністю TST.

Встановлено, що станом на 14-ту добу кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг не викликав суттєвих змін активності тіосульфатзалежного утворення H_2S в міокарді, але підвищив аортальну активність TST на 34,9 % ($p < 0,05$). Станом на 28-му добу застосування $1,25 (OH)_2D_3$ в дозі 0,1 мкг/кг викликало статистично значуще підвищення активності TST в міокарді на 37,5 % ($p < 0,05$). В аорті на 28-му добу також реєструвалась більш висока активність TST (на 29,3 %, $p < 0,05$) порівняно з контролем. Введення кальцитріолу у дозі 1 мкг/кг не спричиняло суттєвих змін активності TST в міокарді станом на 14-ту добу, але викликало значуще підвищення активності TST в аорті на 63,4 % ($p < 0,05$). Однак, на 28-му добу в групі « $1,25 (OH)_2D_3$ 1 мкг/кг» активність TST в міокарді та аорті виявилась нижчою на 28,1 та 25,7 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Таблиця 3.4.

Вплив кальцитріолу на активність тіосульфатзалежного утворення H_2S в міокарді та аорті щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу / Група		Активність TST, нмоль H_2S / хв·мг протеїну			p-value
		Контроль	1,25 (OH) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг	1,25 (OH) ₂ D ₃ 1 мкг/кг	
		1	2	3	
Міокард	14 доба	1,33±0,13	1,67±0,12	1,73±0,16	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} > 0,05$ $p_{2,3} > 0,05$
	28 доба	1,28±0,10	1,76±0,16	0,92±0,12	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} < 0,01$
Аорта	14 доба	1,72±0,17	2,32±0,19	2,81±0,31	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} > 0,05$
	28 доба	1,67±0,13	2,16±0,16	1,24±0,15	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} < 0,01$

За результатами наших досліджень, в групах контролю активність тіоредоксинредуктази (TrxR) в міокарді відповідала діапазону 3,24-5,30 нмоль

DTNB / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 4,30 та IQR [3,85; 4,60], відповідно. В аорті активність TgR була нижчою порівняно із міокардом і знаходилась в діапазоні 1,45-2,53 нмоль DTNB / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 2,16 та IQR [1,82; 2,43], відповідно. За показником міокардіальної та аортальної активності TgR контрольні групи (14-та та 28-ма доба) не відрізнялись. Виявилось, що кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг не викликав суттєвих змін активності TgR в міокарді та аорті станом на 14-ту та 28-му добу (табл. 3.5). У той же час, кальцитріол у дозі 1 мкг/кг на 14-ту добу викликав достовірне зростання активності TgR в міокарді – на 25,0 % ($p < 0,05$), а у аорті – на 42,2 % ($p < 0,05$). Натомість, на 28-му добу введення високої дози кальцитріолу викликало статистично значуще зниження активності TgR. Так, у тварин в групі «1,25 (ОН)₂D₃ 1 мкг/кг» цей показник в міокарді був нижчим на 24,9 % ($p < 0,05$), а в аорті – на 22,3 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Таким чином, кальцитріол у високій дозі спричиняв активацію TgR лише при нетривалому застосуванні.

Таблиця 3.5.

Вплив кальцитріолу на активність тіоредоксинредуктази (TgR) в міокарді та аорті щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу / Група		Активність TgR, нмоль DTNB / хв·мг протеїну			p-value
		Контроль	1,25 (ОН) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг	1,25 (ОН) ₂ D ₃ 1 мкг/кг	
		1	2	3	
Міокард	14 доба	4,12±0,19	4,57±0,35	5,15±0,24	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} > 0,05$
	28 доба	4,37±0,21	4,91±0,37	3,28±0,22	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} < 0,01$ $p_{2,3} < 0,01$
Аорта	14 доба	2,06±0,12	2,17±0,12	2,93±0,23	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} < 0,05$
	28 доба	2,15±0,13	2,36±0,12	1,67±0,15	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} < 0,01$

Далі ми дослідити вплив кальцитріолу на активність сульфітоксидази як прикінцевого етапу мітохондріального метаболізму сульфідів. Відзначимо, що в групах контролю активність сульфітоксидази (SO) в міокарді коливалась у межах 3,44-4,92 нмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 4,26 та IQR [3,65; 4,70], відповідно. В аорті активність SO була дещо нижчою порівняно з міокардом і коливалась у межах 1,72-4,09 нмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / хв·мг протеїну (95 % ДІ) із медіаною 2,79 та IQR [2,28; 3,57], відповідно. Контрольні групи (14-та та 28-ма доба) також були репрезентативним за цим показником в міокарді та аорті. Встановлено, що кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг не викликав суттєвих змін активності SO в міокарді та аорті станом на 14-ту та 28-му добу (табл. 3.6). Кальцитріол у дозі 1 мкг/кг на 14-ту добу також не викликав статистично значущих змін міокардіальної та аортальної активності SO. Однак, на 28-му добу досліді в групі «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг» спостерігалось достовірне зниження активності SO в міокарді на 19,4 % ($p < 0,05$), а в аорті - на 24,6 % ($p < 0,05$), відповідно, порівняно з контролем.

Таблиця 3.6.

Вплив кальцитріолу на активність сульфітоксидази (SO) в міокарді та аорті щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліді / Група		Активність SO, нмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / хв·мг протеїну			p-value
		Контроль	1,25 (OH) ₂ D ₃ 0,1 мкг/кг	1,25 (OH) ₂ D ₃ 1 мкг/кг	
		1	2	3	
Міокард	14 доба	4,31±0,19	4,43±0,28	3,91±0,10	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} > 0,05$ $p_{2,3} > 0,05$
	28 доба	4,16±0,18	4,35±0,27	3,35±0,09	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} < 0,01$ $p_{2,3} < 0,01$
Аорта	14 доба	3,55±0,17	3,68±0,28	3,14±0,13	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} > 0,05$ $p_{2,3} > 0,05$
	28 доба	3,49±0,16	3,73±0,28	2,63±0,09	$p_{1,2} > 0,05$ $p_{1,3} < 0,01$ $p_{2,3} < 0,01$

Резюме. Кальцитріол достовірно впливає на різні шляхи метаболізму H_2S в міокарді та аорті щурів, при цьому виразність та спрямованість ефекту цього гормону залежить від дози та тривалості застосування. $1,25(OH)_2D_3$ у дозі 0,1 мкг/кг викликає підвищення рівня H_2S в аорті та міокарді щурів упродовж 4-х тижнів досліджу, що супроводжується помірним зростанням активності H_2S -продукуючих ензимів (CSE, CAT/3-MST, TST) та H_2S -депонуючого антиоксидантного ензиму (TrxR). $1,25(OH)_2D_3$ у дозі 1 мкг/кг викликає підвищення рівня H_2S в аорті та міокарді упродовж перших 14 діб, стимулює активність H_2S -продукуючих ензимів та TrxR, але при тривалому застосуванні викликає значне падіння активності цих ензимів в спричиняє розвиток дефіциту H_2S в серцево-судинній системі щурів. Найменш чутливим до дії кальцитріолу виявилась SO, активність якої помірно знижувалась в міокарді та аорті лише при тривалому введенні високої дози цього гормону. Найбільш чутливою ланкою щодо стимулюючої та інгібуючої дії кальцитріолу (залежно від дози та режиму введення, відповідно) виявилось CSE-залежне утворення H_2S в міокарді і, особливо, в аорті. Результати дослідження експресії гена *CSE* доводять, що кальцитріол безпосередньо регулює утворення H_2S серцево-судинній системі щурів із стимулюючим ефектом у дозі 0,1 мкг/кг та інгібуючим ефектом у дозі 1 мкг/кг.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [20, 21, 12, 24, 26, 15]

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ КАЛЬЦИТРИОЛУ НА МЕДІАТОРИ АПОПТОЗУ, ЗАПАЛЕННЯ, МАРКЕРИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В МІОКАРДІ, МІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ В АОРТІ ЩУРІВ В УМОВАХ МОДУЛЯЦІЇ СИСТЕМИ H₂S/ CSE

Відомо, що вітамін D, а саме його активна форма 1,25 (OH)₂D₃, бере участь в контролі артеріального тиску, ендотеліального синтезу вазоактивних регуляторів, медіаторів запалення, апоптозу, і в цілому суттєвим чином впливає на функціональний та метаболічний стан серця і судин (див. розділ 1.2). Через міокардальні та ендотеліальні рецептори VDR регулюється експресія чисельних генів, які контролюють синтез цитокінів, факторів транскрипції, антиоксидантних протеїнів, ростових факторів тощо [31; 132]. Результати наших досліджень, наведені у попередньому розділі, засвідчили, що кальцитриол впливає на рівень H₂S та окремі ланки сульфідного метаболізму H₂S в серцево-судинній системі щурів. Цілком ймовірно, що окремі кардіоваскулярні ефекти кальцитриолу можуть реалізуватись через H₂S-залежні сигнальні системи. Адже ендогенний H₂S впливає на адаптивний потенціал кардіоміоцитів та ендотеліоцитів за гіпоксії, ішемії, кардіометаболічних порушень та дії інших несприятливих чинників (див. розділ 1.3). Завданнями даного розділу було: в умовах модуляції стану системи H₂S/ CSE визначити вплив кальцитриолу (у дозах 0,1 та 1 мкг/кг) на медіатори апоптозу, запалення, ЕПР-стресу (каспази-3, фактору некрозу пухлини альфа, протеїнів теплового шоку HSP60, HSP70), маркери оксидативного стресу в серці щурів, а також з'ясувати вплив кальцитриолу на маркери дисфункції ендотелію та мікроскопічні зміни грудної аорти щурів. В якості модуляторів стану системи H₂S/ CSE були використані добре відомі пропаргілгліцин (ППГ) – інгібітор CSE та NaHS – донатор H₂S, які мають протилежно спрямований вплив на рівень ендогенного H₂S. Тривалість експерименту становила 28 діб.

4.1. Вплив кальцитріолу на рівень гідроген сульфід у міокарді та аорті щурів в умовах модуляції стану системи H₂S/ CSE

Спочатку ми оцінили, як змінюється рівень H₂S в міокарді за умов поєданого впливу кальцитріолу (у дозах 0,1 та 1 мкг/кг) та модуляторів системи H₂S/ CSE. Зазначимо, що результати, отримані в умовах даного дослідження, стосовно груп 2 «1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг» та 3 «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг» були аналогічні тим, що описані в розділі 3.1 станом на 28-му добу: введення кальцитріолу у фізіологічному діапазоні концентрацій викликало помірне підвищення рівня H₂S в міокарді, а застосування високої дози цього гормону спричиняло депримуєчий ефект (рис. 4.1.). Зокрема, рівень H₂S в групі контролю становив 2,79±0,11 нмоль/мг протеїну, у той час як в групі 2 «1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг» – 3,31±0,14 нмоль/мг протеїну (p<0,05), а в групі 3 «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг» – 2,10±0,14 нмоль/мг протеїну (p<0,05), відповідно.

Введення ППГ викликало очікуваний виразний дефіцит H₂S в міокарді: рівень H₂S у міокарді щурів в групі 4 «ППГ» становив 1,56±0,10 нмоль/мг протеїну, що було нижчим на 44,1 % (p<0,001) порівняно з контролем. Введення NaHS забезпечило очікуване підвищення рівня H₂S у міокарді до 3,46±0,20 нмоль/мг протеїну, що було вищим на 24,0 % (p<0,01) порівняно з контролем.

При застосуванні модуляторів системи H₂S/ CSE у тварин, що отримували фізіологічну та високу дозу кальцитріолу, спостерігались суттєві відмінності щодо змін рівня ендogenous H₂S у міокарді. Виявилось, що введення ППГ тваринам на тлі застосування 1,25 (OH)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг викликало менш суттєве зниження рівня H₂S в міокарді (на 18,2 % відносно контролю, p<0,05). Введення NaHS потенціювало підвищення рівня H₂S у міокарді в групі щурів, що отримували 1,25 (OH)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг (приріст H₂S становив 37,2 %, p<0,01).

У той же час, введення ППГ щурам, що отримували 1,25 (OH)₂D₃ у дозі 1 мкг/кг, спричиняло значне падіння рівня H₂S в міокарді (на 51,6 %, p< 0,001

порівняно з контролем). Натомість, в групі «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг + NaHS» міокардіальний рівень H₂S майже відповідав такому в контролі (2,59±0,15 нмоль/мг протеїну, p > 0,5) і був достовірно вищим на 23,3 % (p < 0,05), ніж в групі «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг». Отже, застосування NaHS зменшувало депримуєчий вплив високої дози кальцитріолу на систему H₂S / CSE, у той час як введення ППГ цей ефект посилювало.

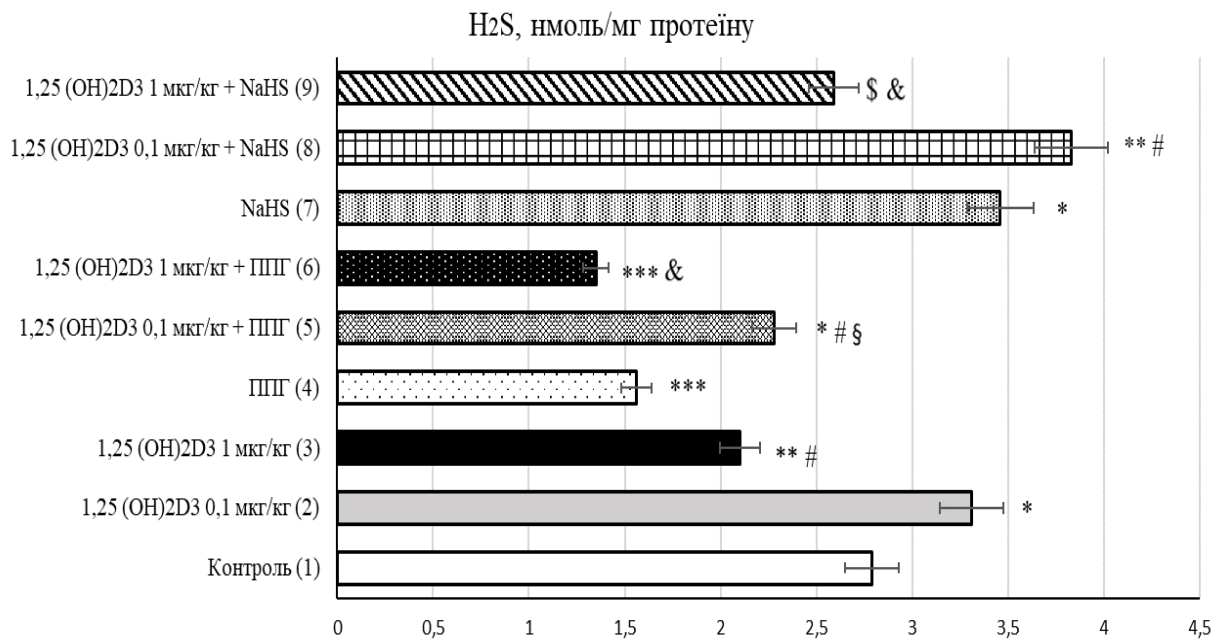


Рис. 4.1. Рівень H₂S в міокарді щурів за умов введення 1,25 (OH)₂D₃ та модуляторів системи H₂S/ CSE (M±m, n=10). Примітка: статистично значущі відмінності: * - p<0,05 відносно групи контролю (** - p<0,01; *** - p<0,001); # - p<0,05 відносно групи 1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг; & - p<0,05 відносно групи 1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг; § - p<0,05 відносно групи ППГ; \$ - p<0,05 відносно групи NaHS.

Дослідження рівня H₂S в грудній аорті щурів виявило схожі закономірності щодо дії кальцитріолу в умовах інгібування / стимуляції системи H₂S / CSE (рис. 4.2.). Зазначимо, що у цій серії дослідів аортальний рівень H₂S в групі контролю становив 1,98±0,06 нмоль/мг протеїну, в групі 2 «1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг» - 2,45±0,09 нмоль/мг протеїну, в групі 3 «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг» - 1,36±0,08 нмоль/мг протеїну, що достовірно відрізнялось від контролю (в | 1,24 - 1,31 | рази, p<0,05). Введення ППГ щурам, які не отримували 1,25 (OH)₂D₃, забезпечило очікуване формування

дефіциту H_2S в аорті: цей показник був нижчим на 56,6 %, ніж в контролі ($p < 0,001$). У щурів, які отримували ППГ на тлі застосування $1,25 (OH)_2D_3$ у дозі 0,1 мкг/кг зниження аортального рівня H_2S було істотно меншим і становило 15,1 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

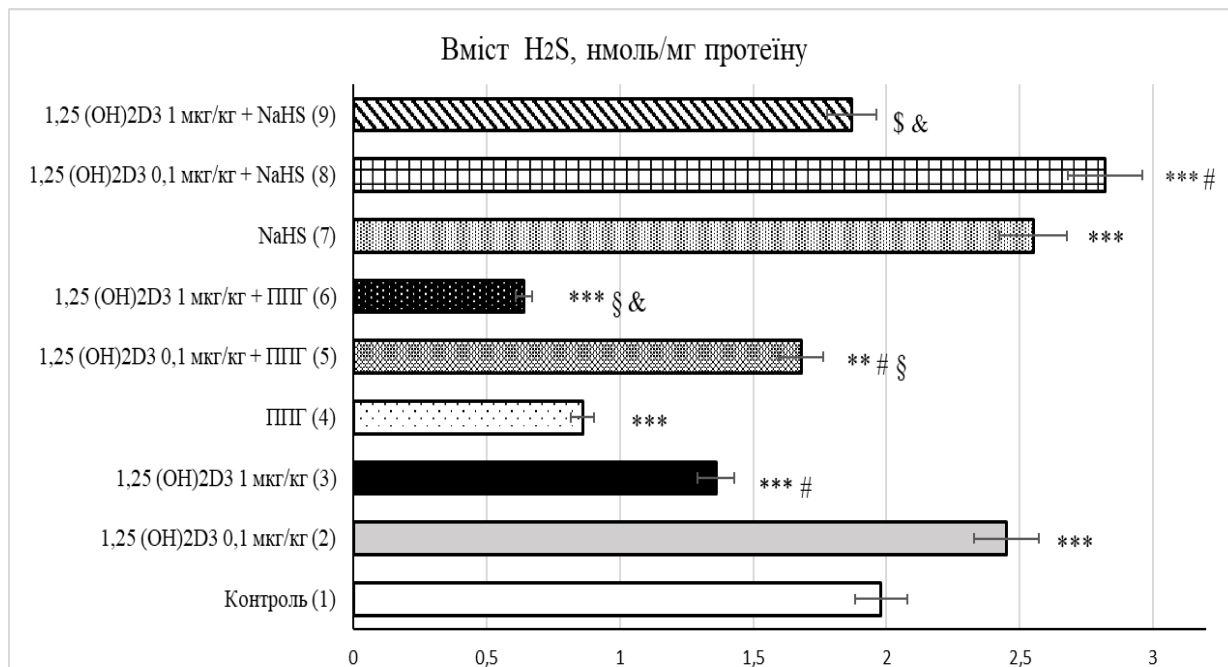


Рис. 4.2. Рівень H_2S в грудній аорті щурів за умов введення $1,25 (OH)_2D_3$ та модуляторів системи H_2S /цистатіонін- γ -ліаза ($M \pm m$, $n=10$). Примітки: 1) * - статистично значущі відмінності відносно групи контролю (** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$); 2) # - $p < 0,05$ відносно групи $1,25 (OH)_2D_3$ 0,1 мкг/кг; 3) § - $p < 0,05$ відносно групи ППГ; 4) & - $p < 0,05$ відносно групи NaHS.

Крім того, в групі « $1,25 (OH)_2D_3$ 0,1 мкг/кг + ППГ» рівень H_2S виявився вищим на 95,3 % ($p < 0,01$), ніж в групі «ППГ». Проте, у щурів, які отримували $1,25 (OH)_2D_3$ у дозі 1 мкг/кг, введення ППГ поглибило дефіцит H_2S на 25,6 % ($p < 0,01$) порівняно з таким у тварин, що отримували ізольоване введення цього інгібітору. Ізольоване введення NaHS забезпечило очікуване підвищення рівня H_2S в аорті (на 28,7 %, $p < 0,01$). Виявилось, що застосування NaHS не викликало надмірного приросту рівня H_2S в аорті щурів, які отримували $1,25 (OH)_2D_3$ у дозі 0,1 мкг/кг, і ефективно запобігало зниженню рівня H_2S при введенні високої дози $1,25 (OH)_2D_3$. Так, рівень H_2S в групах « $1,25 (OH)_2D_3$ 0,1

мкг/кг + NaHS» та «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг + NaHS» був вищим на 15,1 % (p<0,05) та 37,5 % (p<0,01) порівняно з показниками у тварин, які ізольовано отримували аналогічні дози кальцитріолу. Таким чином, модулятори системи H₂S / CSE суттєво модифікують вплив кальцитріолу у фізіологічній та високій дозах на насиченість міокарду та судин ендogenousним H₂S. На наступному етапі ми дослідили як реалізується вплив кальцитріолу у різних дозах на медіатори клітинної смерті та запалення у кардіоміоцитах.

4.2. Вплив кальцитріолу на медіатори апоптозу, запалення та маркери оксидативного стресу в міокарді щурів за умов модуляції системи H₂S / CSE

Фактор некрозу пухлини альфа (TNF α) є одним із важливих індукторів апоптозу в кардіоміоцитах, дія якого реалізується навіть у фізіологічно релевантних концентраціях [141]. Результати наших досліджень показали, що ізольоване введення кальцитріолу у фізіологічній дозі 0,1 мкг/кг упродовж 4 тижнів не викликало суттєвих змін рівня TNF α у міокарді статевозрілих дорослих щурів. У той же час, введення кальцитріолу у високій дозі 1 мкг/кг спричинило достовірне підвищення міокардіального рівня TNF α на 28,3 % (p<0,05) порівняно з контролем, а також на 15,6 % (p<0,05) порівняно з групою «1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг». Введення ППГ спричинило достовірне зростання рівня TNF α у міокарді на 25,4 % (p<0,05) відносно контролю. Виявилось, що при введенні ППГ на тлі фізіологічної дози кальцитріолу приріст рівня TNF α був меншим і становив 14,9 % (p<0,05). Проте, при застосуванні ППГ на тлі високої дози кальцитріолу спостерігалось значне зростання міокардіального рівня TNF α – на 54,1 % порівняно з контролем і на 24,7 % вище, ніж в групі «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг». Введення NaHS не викликало статистично значущих змін рівня TNF α в міокарді щурів при ізольованому введенні (група 7) та на тлі застосування кальцитріолу у дозі 0,1 мкг/кг. При цьому, на тлі високої дози кальцитріолу введення NaHS стримувало підвищення міокардіального рівня

TNF α : цей показник в групі «1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 1 мкг/кг + NaHS» виявився нижчим на 14,5 % (p<0,05), ніж в групі «1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 1 мкг/кг». Отже, в умовах дефіциту H $_2$ S прозапальний вплив високої дози кальцитріолу істотно посилюється, у той час як підвищення міокардіального рівня насиченості H $_2$ S зменшує цей ефект.

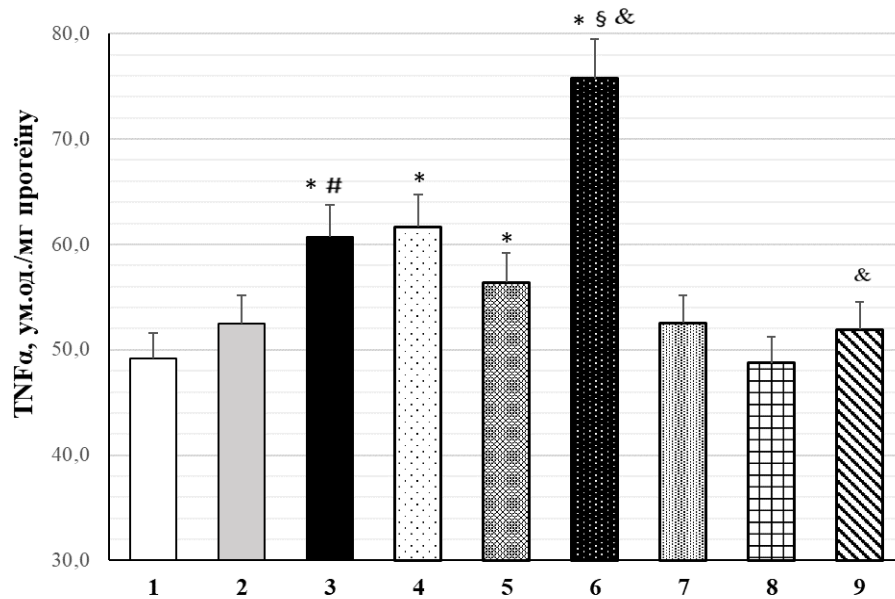


Рис. 4.3. Рівень фактору некрозу пухлин альфа (TNF α) в міокарді щурів за умов введення 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ та модуляторів системи H $_2$ S/ CSE (M \pm m, n=8-10). Примітки: 1) групи: 1 – контроль; 2 – 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 0,1 мкг/кг; 3 – 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 1 мкг/кг; 4 – ППГ; 5 – 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 0,1 мкг/кг +ППГ; 6 –1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 1 мкг/кг +ППГ; 7 – NaHS; 8 – 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 0,1 мкг/кг + NaHS; 9 – 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 1 мкг/кг + NaHS; 2) * -p<0,05 відносно групи контролю; # -p<0,05 відносно групи 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 0,1 мкг/кг; & -p<0,05 відносно групи 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 1 мкг/кг; § -p<0,05 відносно групи ППГ; \$ -p<0,05 відносно групи NaHS.

Як відомо, в реалізації процесу апоптозу ключову роль відіграє ефекторна каспаза-3, індуктором якої можуть виступати TNF α та іони кальцію [291]. Тому на наступному етапі ми дослідили вплив кальцитріолу на вміст цього проапоптичного протеїну в міокарді за дії модуляторів системи H $_2$ S / CSE. Встановлено, що ізольоване введення кальцитріолу у дозі 0,1 мкг/кг

упродовж 4 тижнів не викликало суттєвих змін рівня каспази-3 у міокарді щурів (рис. 4.4.). Натомість, введення кальцитріолу у дозі 1 мкг/кг викликало статистично значуще підвищення рівня каспази-3 на 25,3 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Ізольоване введення ППГ викликало суттєве підвищення рівня каспази-3 у міокарді - на 42,2 % ($p < 0,05$) відносно контролю. Однак, при введенні ППГ у поєднанні з кальцитріолом у дозі 0,1 мкг/кг приріст рівня каспази-3 був меншим і становив 26,7 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем

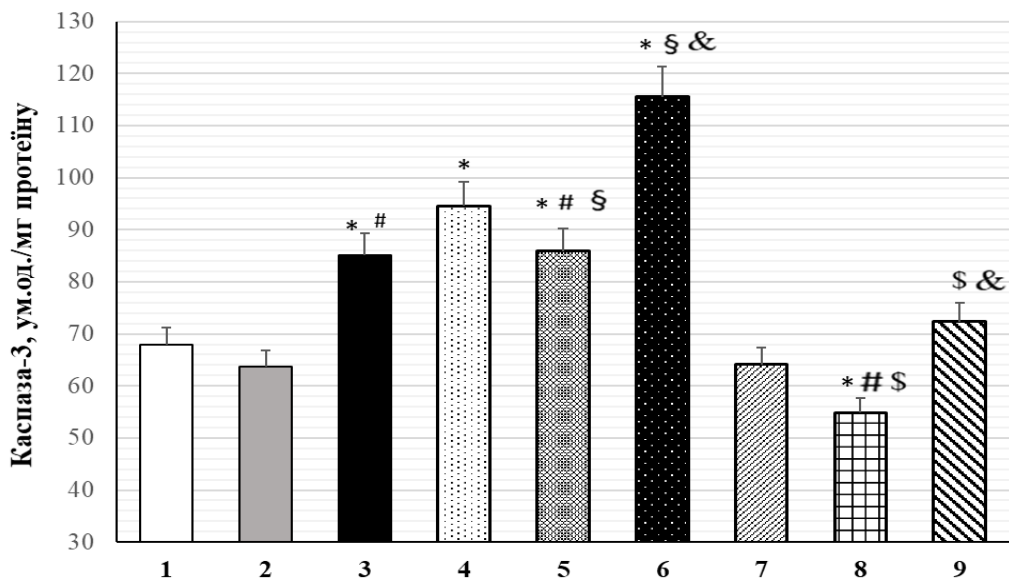


Рис. 4.4. Рівень каспази-3 в міокарді щурів за умов введення $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ та модуляторів системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ ($M \pm m$, $n=8-10$). Примітки: 1) групи: 1 – контроль; 2 – $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг; 3 – $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг; 4 – ППГ; 5 – $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг + ППГ; 6 – $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг + ППГ; 7 – NaHS; 8 – $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг + NaHS; 9 – $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг + NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи контролю; # - $p < 0,05$ відносно групи $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг; & - $p < 0,05$ відносно групи $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг; § - $p < 0,05$ відносно групи ППГ; \$ - $p < 0,05$ відносно групи NaHS.

При введенні ППГ у поєднанні з кальцитріолом у дозі 1 мкг/кг відбувалось значне підвищення рівня каспази-3 в міокарді – на 70,2 % ($p < 0,001$) порівняно з контролем і на 35,8 % ($p < 0,05$) порівняно з групою « $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг». Ізольоване введення NaHS не викликало статистично

значущих змін рівня каспази-3 в міокарді. Однак при поєднаному застосуванні NaHS та кальцитріолу у дозі 0,1 мкг/кг спостерігалось помірне зниження рівня каспази-3 (на 19,1 %, $p < 0,05$) порівняно з контролем. Введення NaHS на тлі застосування високої дози кальцитріолу запобігало зростанню рівня каспази-3 і цей показник виявився нижчим на 15,6 % ($p < 0,05$) порівняно з групою «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг».

Таким чином, проапоптичний ефект високої дози кальцитріолу в умовах інгібування системи H₂S/ CSE посилюється і практично нівелюється при застосуванні донатору H₂S. В умовах підвищення насиченості міокарду ендogenous H₂S виявляється антиапоптичний ефект фізіологічної дози активної форми вітаміну D.

На наступному етапі ми дослідили вплив кальцитріолу на рівень протеїнів теплового шоку (Hsp70, Hsp60), які регулюють клітинний протеостаз і фолдинг, процеси апоптозу, адаптації до стресу, виживаність клітин. Вважається, що внутрішньоклітинний Hsp70 проявляє переважно антиапоптичну дію, у той час як Hsp60 стимулює апоптоз та запальну реакцію. Встановлено, що введення фізіологічної дози кальцитріолу не викликало суттєвих змін рівня Hsp70 в міокарді щурів (рис. 4.5. А). Натомість введення високої дози кальцитріолу спричинило помірне зниження рівня Hsp70 (на 17,2 % $p < 0,05$) відносно контролю. Введення ППГ також викликало невелике зниження рівня Hsp70 - на 14,8 % ($p < 0,05$) відносно контролю. При введенні ППГ на тлі застосування 1,25 (OH)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг спостерігалось менш виразне зниження міокардіального рівня Hsp70 - на 11,6 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. У той же час, при застосуванні ППГ на тлі введення 1,25 (OH)₂D₃ у дозі 1 мкг/кг виникало значне падіння рівня Hsp70 (на 32,2 %, $p < 0,001$). Ізольоване застосування NaHS не викликало змін рівня Hsp70, але при його поєднанні з фізіологічною дозою кальцитріолу спричинило помірне підвищення рівня цього протеїну (на 12,5 %, $p < 0,05$) порівняно з контролем.

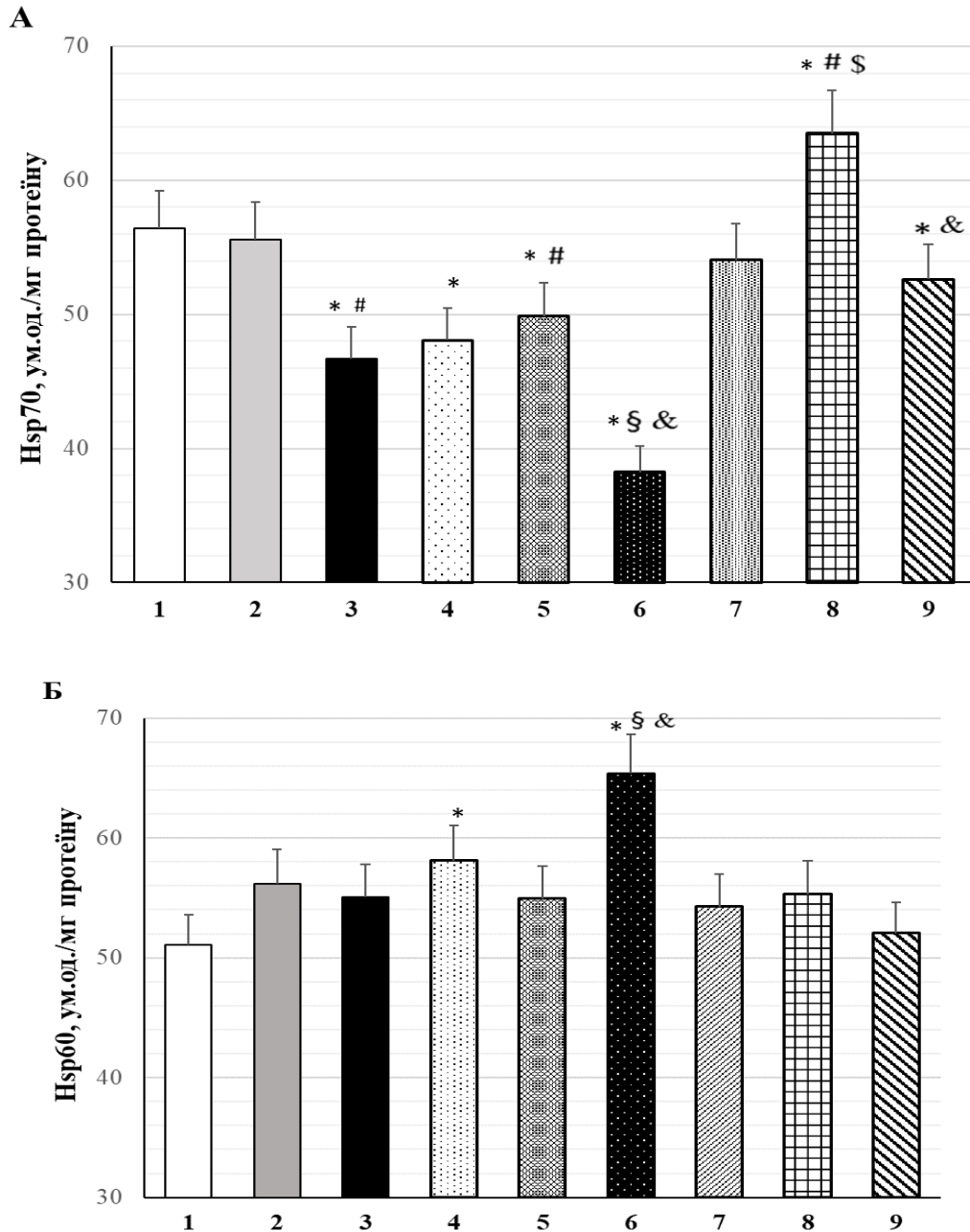


Рис. 4.5. Рівень протеїнів теплового шоку Hsp70 і Hsp60 в міокарді щурів за умов введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ та модуляторів системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ ($M \pm m$, $n=8-10$). Примітки: 1) групи: 1 – контроль; 2 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг; 3 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг; 4 – ППГ; 5 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг +ППГ; 6 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг +ППГ; 7 – NaHS; 8 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг + NaHS; 9 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг + NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи контролю; # - $p < 0,05$ відносно групи $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг; & - $p < 0,05$ відносно групи $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг; § - $p < 0,05$ відносно групи ППГ; \$ - $p < 0,05$ відносно групи NaHS.

Введення NaHS на тлі застосування $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 1 мкг/кг запобігало падінню рівня Hsp70: в групі « $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг + NaHS» цей показник був достовірно вищий на 12,8 % ($p < 0,05$), ніж в групі « $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг».

Виявилось, що введення фізіологічної та високої дози кальцитріолу не спричиняло статистично значущих змін рівня Hsp60 в міокарді щурів (рис. 4.5.Б). Однак, при введенні ППГ спостерігалось невелике підвищення рівня Hsp60 - на 13,8 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. При поєднаному введенні ППГ та $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 0,1 мкг/кг не спостерігалось зростання рівня Hsp60. Однак, при введенні ППГ у поєднанні з $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 1 мкг/кг спостерігалось помірне підвищення рівня Hsp60 – на 28,1 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Введення NaHS, як ізольоване, так і у поєднанні з кальцитріолом у фізіологічній та високій дозах, не викликало достовірних змін рівня Hsp60 в міокарді щурів.

У якості додаткової характеристики впливу кальцитріолу на протеїни теплового шоку за умов модуляції стану системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ ми дослідили зміни у їхньому співвідношенні – коефіцієнт Hsp70/ Hsp60. Виявилось, що цей показник більш інформативно відображає дисбаланс в системі протеїнів – регуляторів клітинного стресу (рис. 4.6.). Так, в контролі коефіцієнт Hsp70/ Hsp60 коливався у межах 0,94-1,36 (95 % ДІ) і в середньому становив $1,12 \pm 0,06$. Введення кальцитріолу в дозі 0,1 мкг/кг викликало тенденцію до зниження коефіцієнта Hsp70/ Hsp60 (до $0,99 \pm 0,03$ ум.од., $p = 0,165$, $U = 14,0$, тест Манна-Уїтні). Ізольоване введення ППГ також спричинило зниження цього показника до $0,83 \pm 0,04$ ум.од., що було нижчим за показник в контролі на 25,9 % ($p = 0,001$, $U = 3,5$, тест Манна-Уїтні). При введенні ППГ на тлі кальцитріолу 0,1 мкг/кг коефіцієнт Hsp70/ Hsp60 становив $0,91 \pm 0,02$ ум.од. і був на 18,8 % нижчим, ніж в контролі ($p < 0,05$). Натомість, при поєднанні ППГ з кальцитріолом у дозі 1 мкг/кг реєструвалось значне зниження коефіцієнту Hsp70/ Hsp60 до $0,59 \pm 0,03$ ум.од., що на 47,3 % ($p < 0,001$) нижче порівняно з контролем, а також на 28,9 та 31,4 % ($p < 0,001$) нижче порівняно з групах «ППГ» та « $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг». Ізольоване введення NaHS, а також його

поєднання з введенням кальцитріолу порушувало балансу в системі протеїнів теплового шоку: коефіцієнти Hsp70/ Hsp60 в групах «NaHS», «1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг + NaHS» та «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг + NaHS» становили 1,01±0,05; 1,16±0,06 та 1,03±0,02 ум.од. і практично відповідали показнику в групі контролю (p > 0,5). У той же час, застосування кальцитріолу в дозі 1 мкг/кг спричинило достовірне зниження коефіцієнта Hsp70/ Hsp60 до 0,86±0,05 ум.од., що було меншим за показник групи контролю на 23,2 % (p=0,007, U=4,5, тест Манна-Уїтні).

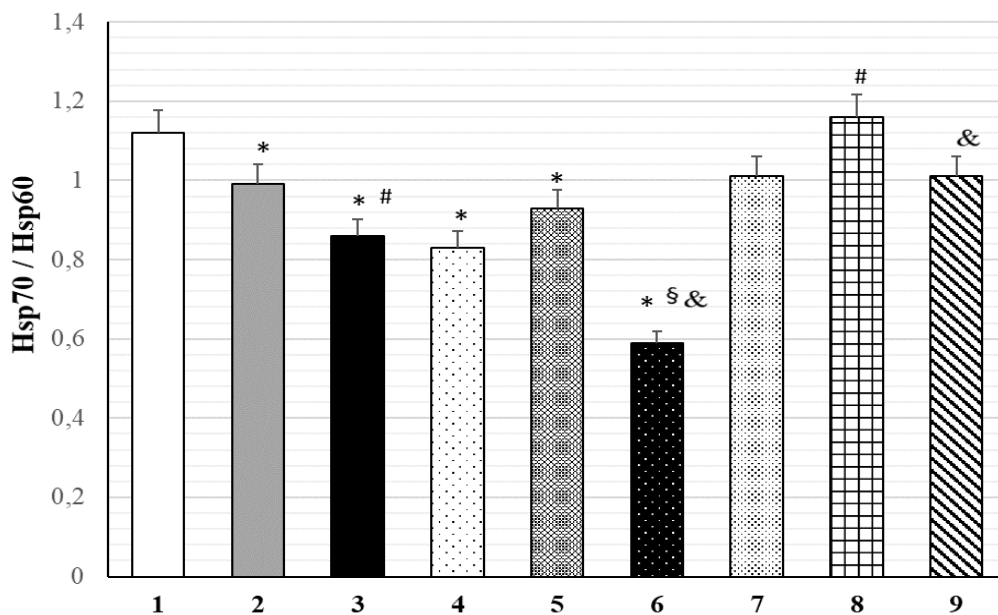


Рис. 4.6. Коефіцієнт Hsp70/Hsp60 в міокарді щурів за умов введення 1,25 (OH)₂D₃ та модуляторів системи H₂S/ CSE (M±m, n=8-10). Примітки: 1) групи: 1 – контроль; 2 – 1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг; 3 – 1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг; 4 – ППГ; 5 – 1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг +ППГ; 6 –1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг +ППГ; 7 – NaHS; 8 – 1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг + NaHS; 9 – 1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг + NaHS; 2) * - p<0,05 відносно групи контролю; # - p<0,05 відносно групи 1,25 (OH)₂D₃ 0,1 мкг/кг; & - p<0,05 відносно групи 1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг; § - p<0,05 відносно групи ППГ; § - p<0,05 відносно групи NaHS.

Таким чином, інгібування системи H₂S/ CSE викликало формування дисбалансу в експресії протеїнів теплового шоку в міокарді щурів, який

характеризувався переважанням проапоптичного Hsp60 над антиапоптичним Hsp70. Підвищення рівня насиченості міокарду H_2S сприяло підтриманню нормального співвідношення рівнів досліджуваних протеїнів теплового шоку на тлі застосування як фізіологічної, так і високої дози кальцитріолу.

Існують докази, що кальцитріол може безпосередньо зменшувати оксидативний стрес в кардіоміоцитах [215] і впливати на синтез глутатіону [115]. За результатами наших досліджень, кальцитріол у фізіологічних та високих дозах протилежно впливав на міокардіальний рівень H_2S , що також може відобразитись на редокс-регуляції. Тому на наступному етапі було оцінено вплив кальцитріолу на маркери ліпопероксидації та окиснювальної деструкції протеїнів в міокарді тварин за модуляції стану системи H_2S / CSE.

Введення кальцитріолу у фізіологічній дозі упродовж 28-ми діб не викликало статистично значущих змін рівнів малонового діальдегіду (МДА) та карбонільних груп протеїнів в міокарді щурів (рис. 4.8.). У той же час, застосування високої дози кальцитріолу спричинило підвищення рівня МДА (на 48,2 %, $p < 0,01$) та карбонільних груп (на 50 %, $p < 0,01$) порівняно з контролем. Отже, $1,25 (OH)_2D_3$ у дозі 1 мкг/кг виявив прооксидантний ефект. Ізольоване введення ППГ викликало очікувані ознаки оксидативного стресу в міокарді, про що свідчить підвищення рівнів МДА (на 75,6 %, $p < 0,001$) та карбонільних груп (на 116 %, $p < 0,001$) порівняно з контролем. За умов поєднаного застосування ППГ та кальцитріолу у дозі 0,1 мкг/кг статистично значущих змін маркерів оксидативного стресу у міокарді не спостерігалось. Проте, при введенні ППГ на тлі високої дози кальцитріолу в міокарді реєструвалось достовірне зростання рівнів МДА (на 86,7 %, $p < 0,001$) та карбонільних груп (на 161 %, $p < 0,001$) порівняно з контролем.

Введення NaHS, як ізольоване, так і у поєднанні з фізіологічною дозою кальцитріолу не викликало суттєвих змін маркерів оксидативного стресу в міокарді щурів. При цьому, введення NaHS зменшувало прооксидантний ефект високої дози кальцитріолу.

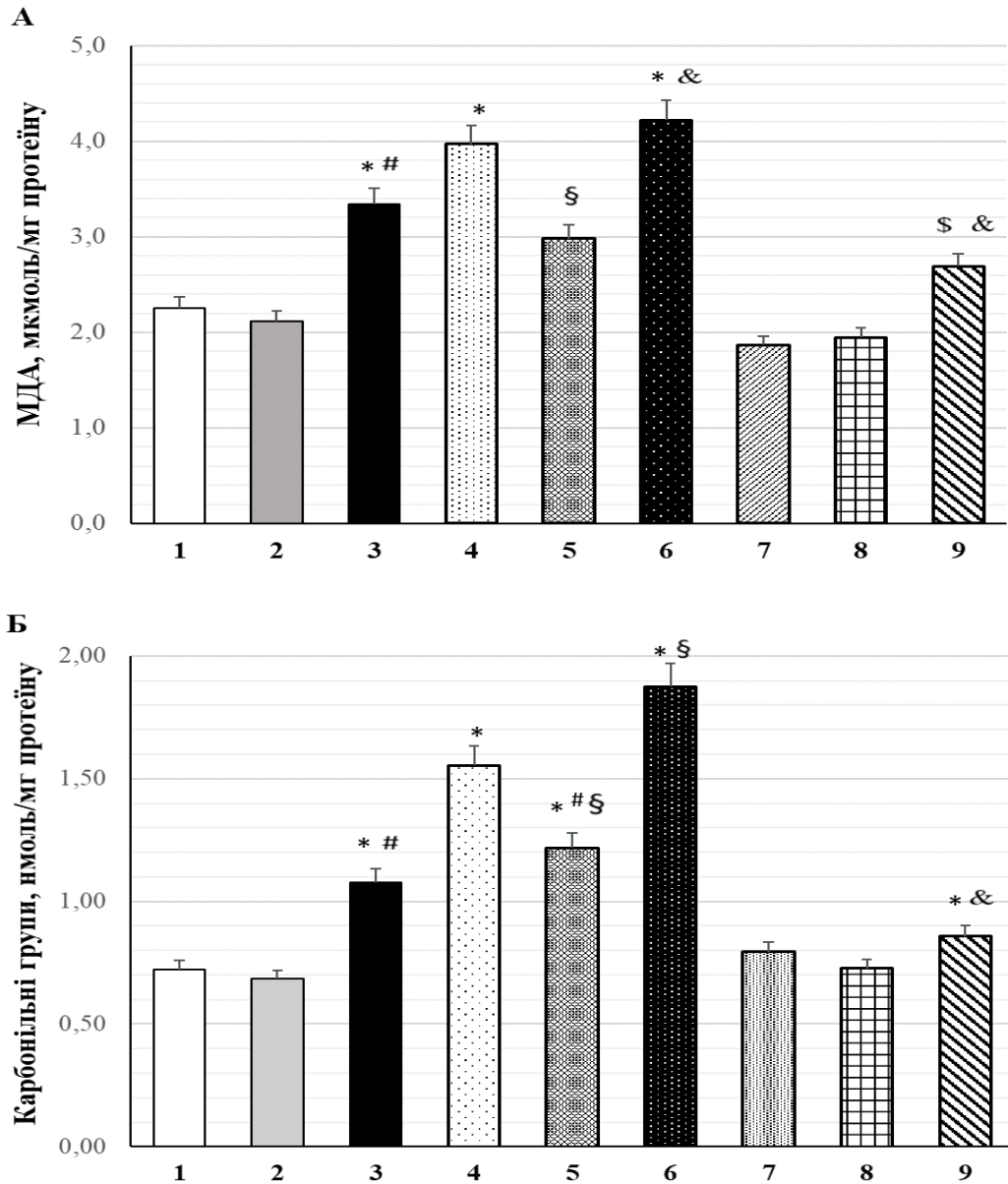


Рис. 4.8. Рівень МДА (А) та карбонільних груп протеїнів (Б) в міокарді щурів за умов введення $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ та модуляторів системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ ($M \pm m$, $n=8-10$). Примітки: 1) групи: 1 – контроль; 2 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг; 3 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг; 4 – ППГ; 5 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг +ППГ; 6 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг +ППГ; 7 – NaHS; 8 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг + NaHS; 9 – $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг + NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи контролю; # - $p < 0,05$ відносно групи $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 0,1 мкг/кг; & - $p < 0,05$ відносно групи $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 1 мкг/кг; § - $p < 0,05$ відносно групи ППГ; \$ - $p < 0,05$ відносно групи NaHS.

Так, в групі «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг + NaHS» рівні МДА та карбонільних груп протеїнів виявились нижчими на 19,7 та 20,4 % ($p < 0,05$), ніж в групі «1,25 (OH)₂D₃ 1 мкг/кг». Таким чином, система H₂S/ CSE дотична до реалізації антиоксидантної дії кальцитріолу, яка спостерігається у фізіологічному діапазоні концентрацій. Підвищення рівня насиченості міокарду H₂S нівелює прооксидантний ефект високої дози кальцитріолу, який натомість посилюється при дефіциті H₂S.

Згідно з вищенаведеними результатами можна констатувати, що модулятори системи H₂S здатні модифікувати вплив кальцитріолу на сигнальні системи запалення та апоптозу кардіоміоцитів, і цей ефект може реалізуватись через розвиток оксидативного стресу. Ендогенний H₂S є потужним антиоксидантом і формування його дефіциту в міокарді за умов застосування надфізіологічної дози кальцитріолу може асоціюватись з мітохондріальною дисфункцією і зумовлювати підвищення рівнів медіаторів каспази-3, TNF α , АТФ-залежних шаперонів Hsp60, Hsp70. Кореляційний аналіз (табл. 4.1) підтвердив наявність статистично значущих асоціацій між рівнем H₂S та маркерами апоптозу, запалення та оксидативного стресу в міокарді щурів.

Таблиця 4.1.

Коефіцієнти кореляції рівня H₂S з маркерами запалення, апоптозу, оксидативного стресу в міокарді щурів (n=90)

Показник	Коефіцієнти кореляції Spearman (r_{sp})					
	Каспаза-3	Hsp70	Hsp60	TNF α	МДА	КГ
H ₂ S (міокард)	-0,76	0,60	-0,33	-0,61	-0,52	-0,55
p-value	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	<0,001	<0,001

Примітка. КГ – карбонільні групи протеїнів.

За цих умов, найбільш сильні обернені зв'язки виявлялись між міокардіальним рівнем H₂S та рівнем каспази-3 ($r_{sp} = -0,76$, $p < 0,001$) і TNF α

($r_{sp} = -0,61$, $p < 0,001$). Також сильний прямиий зв'язок виявлявся між рівнем H_2S та рівнем цитопротекторного медіатора Hsp70 ($r_{sp} = 0,60$, $p < 0,001$). Зв'язки між міокардіальним рівнем H_2S та іншими показниками були середньої сили.

Статистично значущий прямиий кореляційний зв'язок виявлявся також між міокардіальним рівнем H_2S та коефіцієнтом Hsp70/ Hsp60 (рис. 4.9.), що є додатковим доказом тісної асоціації між змінами в системі H_2S / CSE та дисбалансом експресії протеїнів теплового шоку в серці та судинах щурів.

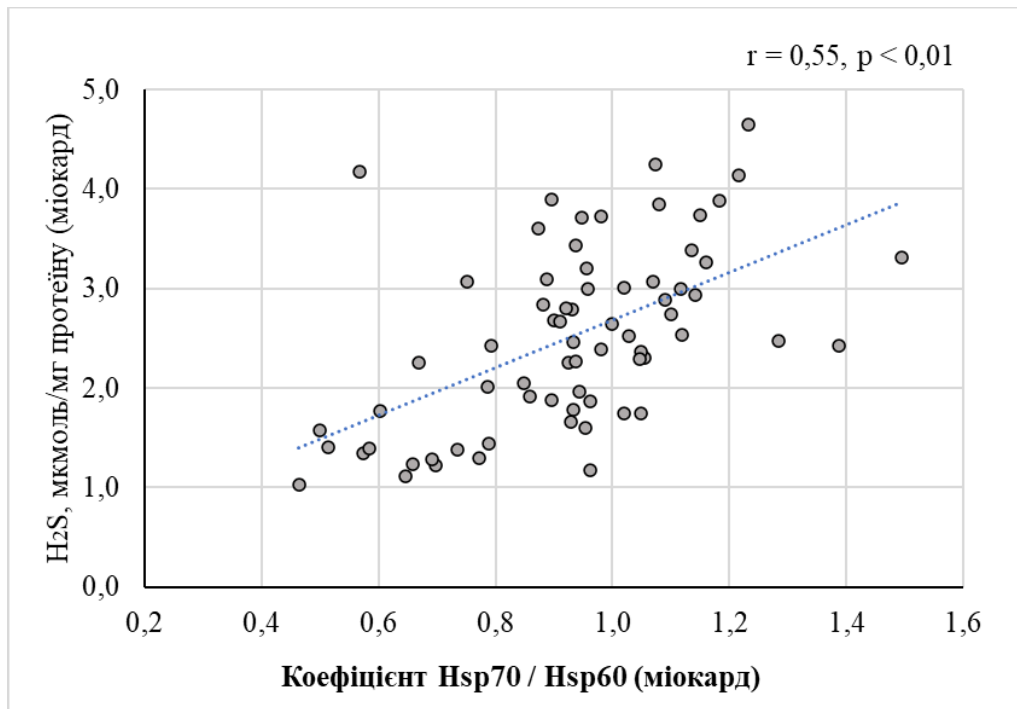


Рис. 4.9. Кореляційна залежність між коефіцієнтом Hsp70/ Hsp60 та рівнем H_2S в міокарді щурів ($n=90$, r-Pearson).

4.3. Вплив кальцитріолу на сироватковий рівень ендотеліну-1 та морфологічний стан грудної аорти щурів в умовах модуляції системи H_2S / CSE

На наступному етапі було проведено дослідження впливу кальцитріолу на показники стану грудної аорти щурів в умовах модуляції системи H_2S / CSE. Одним із чутливих маркерів активації ендотелію та ендотеліальної дисфункції є зростання в сироватці крові рівня потужного вазоконстриктора ендотеліну-1

[137]. Існують дані, що кальцитріол може стимулювати судинну експресію ендотеліну-1 [168; 39], натомість H_2S справляє протилежний ефект [109]. Тому на наступному етапі ми дослідили вплив кальцитріолу у різних концентраціях на рівень ендотеліну-1 в сироватці крові за дії модуляторів системи H_2S / CSE. В умовах даного дослідження рівень ендотеліну-1 у щурів групи контролю коливався у межах 0,41-0,67 фмоль/мл (95 % ДІ) із медіаною 0,53 та IQR [0,45; 0,64] фмоль/мл. Виявилось, що ізольоване введення кальцитріолу у дозі 0,1 мкг/кг упродовж 4-х тижнів не викликало змін рівня ендотеліну-1 в сироватці крові щурів (рис. 4.10.), який становив $0,493 \pm 0,044$ фмоль/мл і за середніми величинами відповідав такому в контролі ($0,539 \pm 0,034$ фмоль/мл, $p > 0,05$). У щурів, які отримували кальцитріол у дозі 1 мкг/кг, сироватковий рівень ендотеліну-1 становив $1,22 \pm 0,13$ фмоль/мл, що було вищим на 126,3 % ($p < 0,001$) порівняно з контролем і на 147,5 % вищим, ніж в групі « $1,25 (OH)_2D_3$ 0,1 мкг/кг».

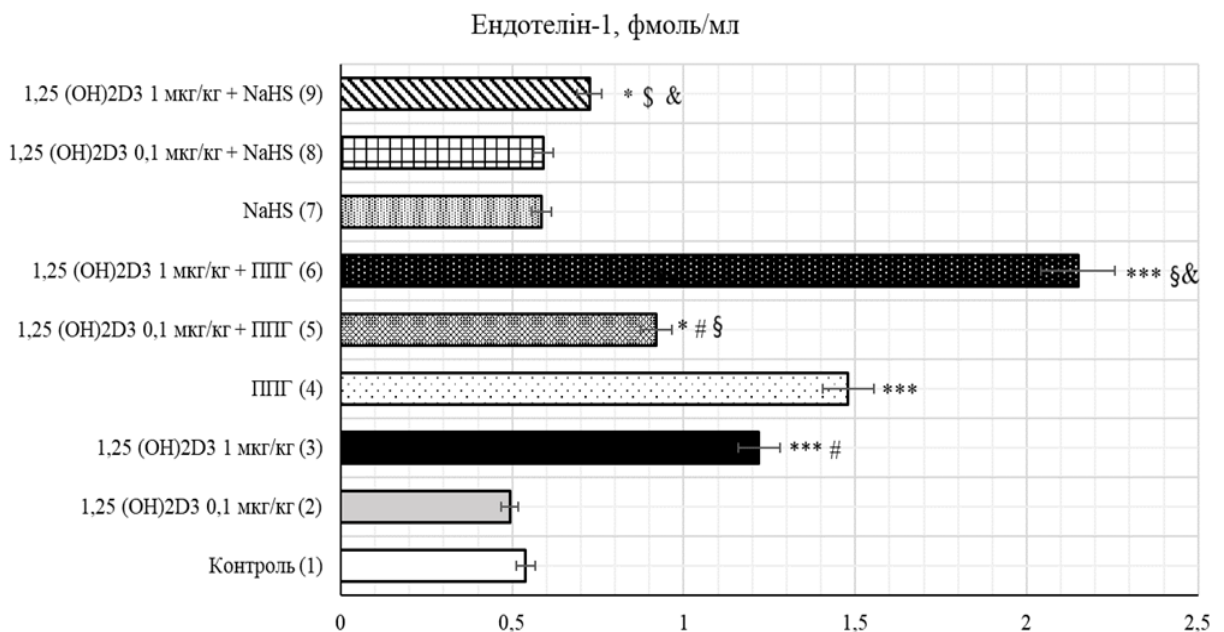


Рис. 4.10. Рівень ендотеліну-1 в сироватці крові щурів за умов введення $1,25 (OH)_2D_3$ та модуляторів системи H_2S / CSE ($M \pm m$, $n=10$). Примітка. * - $p < 0,05$ відносно групи контролю (** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$); # - $p < 0,05$ відносно групи $1,25 (OH)_2D_3$ 0,1 мкг/кг; & - $p < 0,05$ відносно групи $1,25 (OH)_2D_3$ 1 мкг/кг; § - $p < 0,05$ відносно групи ППГ; § - $p < 0,05$ відносно групи NaHS.

Ізольоване введення ППГ викликало значне зростання рівня ендотеліну-1 в сироватці крові - на 174,6 % ($p < 0,001$) відносно контролю. Виявилось, що при введенні ППГ у поєднанні з кальцитріолом у дозі 0,1 мкг/кг рівень ендотеліну-1 підвищився менш суттєво – на 70,7 % ($p < 0,01$) порівняно з контролем. Натомість, при застосуванні ППГ у поєднанні з кальцитріолом у дозі 1 мкг/кг сироватковий рівень ендотеліну-1 підвищився в 3,98 рази ($p < 0,001$) порівняно з контролем і перевищував цей показник в групі «1,25 (ОН)₂D₃ 1 мкг/кг» на 76,2 % ($p < 0,01$), відповідно. Введення NaHS, як ізольоване, так і у поєднанні з «1,25 (ОН)₂D₃ 0,1 мкг/кг» не викликало статистично значущих змін сироваткового рівня ендотеліну-1, який практично відповідав такому в контролі. При поєднаному застосуванні NaHS та кальцитріолу у високій дозі (1 мкг/кг) рівень ендотеліну-1 виявився нижчим на 40,6 % ($p < 0,05$) порівняно з групою «1,25 (ОН)₂D₃ 1 мкг/кг» і всього на 34,5 % ($p < 0,05$) був вищим за показник в групі контролю.

Кореляційний аналіз підтвердив наявність статистично значущого зв'язку між рівнем ендотеліну-1 та рівнем H₂S в аорті щурів (рис. 4.11.).

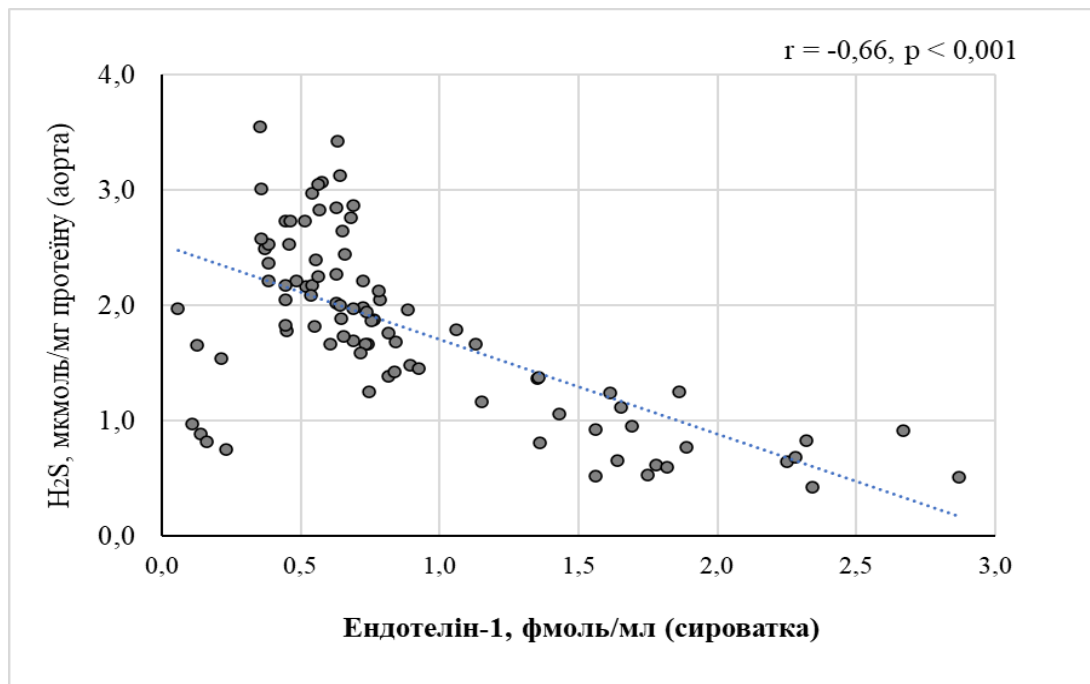


Рис. 4.11. Кореляційна залежність між рівнем ендотеліну-1 в сироватці крові та рівнем H₂S в аорті щурів (n=90, r-Pearson).

Таким чином, при кальцитріол у високій дозі, ППГ та їх сумісне застосування викликали чіткі ознаки ендотеліальної дисфункції. Для більш детальної оцінки стану судин за цих умов було проведено мікроскопічне дослідження стану грудної аорти щурів усіх дослідних груп.

Дослідження морфологічного стану грудної аорти щурів контрольної групи засвідчило наступні загальні закономірності її структурної організації. Стінка аорти складалась із трьох шарів: внутрішнього, середнього і зовнішнього (рис. 4.12. А). Внутрішній шар з боку просвіту аорти був вистелений ендотелієм, під яким розташовувався тонкий шар пухкої сполучної тканини і відокремлювався від середнього шару внутрішньою пограничною мембраною. Середній шар був утворений шарами косо орієнтованих гладком'язових клітин, які чередувались з еластичними ламелами. Середній шар відмежовувався від зовнішнього шару зовнішньою еластичною мембраною. Зовнішній шар був утворений пухкою сполучною тканиною: фібробластами, колагеновими і еластичними волокнами, макрофагами (рис. 4.12. А).

При гістологічному дослідженні аорти щурів, які отримували кальцитріол у фізіологічній дозі (0,1 мкг/кг), суттєвих змін структурної організації судини не виявлено (рис. 4.12. Б). Зберігалась цілісність ендотеліальної вистілки внутрішнього шару стінки аорти та внутрішньої пограничної мембрани. У середньому шарі виявлялась звичайна структура гладком'язових клітин, зберігалась коса орієнтація їх шарів та чередування з еластичними ламелами. Пухка сполучна тканина зовнішнього шару містила характерні клітинні елементи (фібробласти, макрофаги) та колагенові і еластичні волокна.

Натомість, у щурів, які отримували кальцитріол у високій дозі 1 мкг/кг упродовж 4-х тижнів, виникли характерні зміни морфологічного стану аорти (рис. 4.12, В). Виявлено порушення плазматичної мембрани ендотеліоцитів аорти та адгезія еритроцитів до поверхні ендотелію.

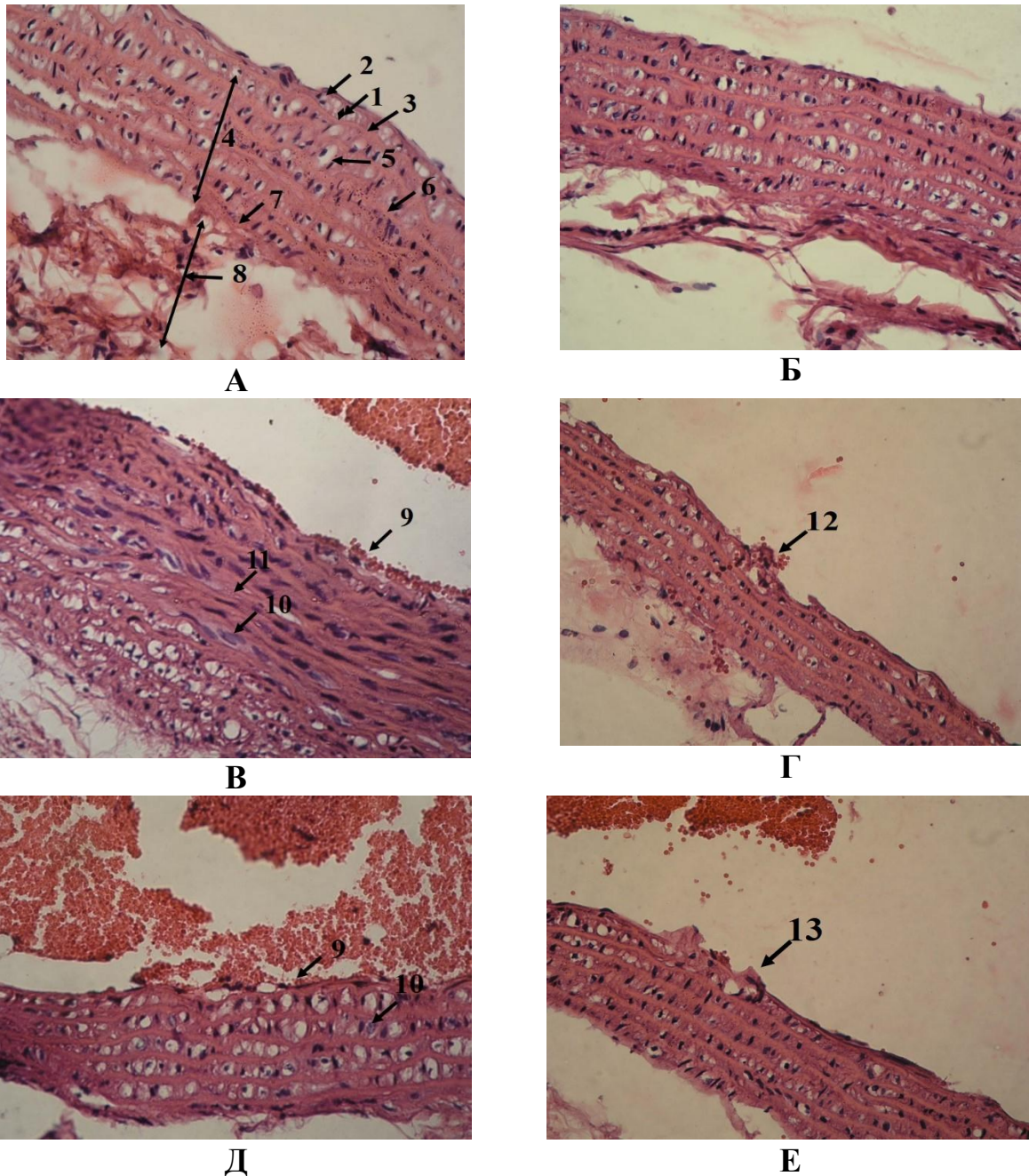


Рис. 4.12. Мікроскопічна організація грудної аорти щурів за дії кальцитріолу та пропаргілгліцину (ППГ). Примітки: А - контроль, Б - 1,25 (ОН)₂D₃ 0,1 мкг/кг, В - 1,25 (ОН)₂D₃ 1 мкг/кг, Г - ППГ, Д - 1,25 (ОН)₂D₃ 0,1 мкг/кг + ППГ, Е - 1,25 (ОН)₂D₃ 1 мкг/кг + ППГ. Забарвлення гематоксилін-еозином, ×400 (ок. 10, об. 40). 1 – внутрішній шар аорти, 2 – ендотелій, 3 – внутрішня еластична мембрана, 4 – середній шар аорти, 5 – гладком’язові клітини, 6 – еластичні ламели, 7 – зовнішня еластична мембрана, 8 – зовнішній шар аорти, 9 – адгезія еритроцитів, 10 – набряк гладком’язових клітин, 11 – кальцифікати, 12 – злущування ендотеліоцитів, 13 – набряк ендотеліоцитів.

Спостерігались потовщення внутрішньої та середньої оболонки аорти, проліферація гладком'язових клітин середньої оболонки та їх набряк. Також у внутрішньому та середньому шарах стінки аорти були виявлені кальцифікати, що не спостерігалось у щурів групи контролю та групи, яка одержувала кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг.

Встановлено, що ізольоване введення ППГ упродовж 4-х тижнів викликало у щурів ознаки пошкодження ендотелію і стромальних елементів аорти із потовщенням внутрішньої еластичної мембрани (рис. 4.12. Г). Виявлявся набряк ендотеліоцитів, їх злуцування, зменшення розмірів гладком'язових клітин, подекуди мала місце адгезія еритроцитів до поверхні ендотеліоцитів. У щурів, які отримували кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг, введення ППГ також викликало зміни структури стінки аорти (рис. 4.12. Д). Спостерігалась адгезія еритроцитів до поверхні ендотелію, зберігався набряк і дегенеративні зміни судинної стінки. При цьому не виявлялось проліферації гладком'язових клітин середньої оболонки і, відповідно, не спостерігалось потовщення судинної стінки.

У щурів, що отримували кальцитріол у дозі 1 мкг/кг, введення ППГ істотно поглиблювало патологічні зміни стінки аорти. Так, виявлено значні порушення внутрішньої оболонки аорти: із виразним набряком ендотеліоцитів, їх злуцуванням і оголенням сполучнотканинного матриксу в просвіт судини, що є небезпечним фактором активації згортання крові. Реєструвалось просочування еритроцитів у стінку аорти. Спостерігалось потовщення внутрішньої еластичної мембрани. Одночасно відбувалось витончення середньої оболонки аорти, зменшення розмірів гладком'язових клітин на тлі потовщення еластичних ламел (рис. 4.12. Е).

Таким чином, інгібування продукування H_2S модифікує небажаний вплив високих доз кальцитріолу на стан судинної стінки, про що свідчить поглиблення мікроскопічних ознак пошкодження ендотелію, потовщення внутрішньої еластичної мембрани та зміни гладком'язових клітин. З іншого

боку, кальцитріол у фізіологічній (умовно терапевтичній) дозі зменшував прояви вазотоксичного ефекту ППГ.

Дослідження морфологічного стану аорти щурів, які отримували кальцитріол на тлі введення донорів H_2S , виявило наступні особливості. У щурів, які не отримували кальцитріол, та у щурів, які отримували кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг, введення NaHS упродовж 4-х тижнів не викликало змін структурної організації стінки аорти (рис. 4.13. А, Б). Внутрішній шар стінки аорти мав цілісну ендотеліальну вистілку, відокремлювався внутрішньою пограничною мембраною від середнього шару. У середньому шарі гладком'язові клітини мали звичайну структуру, їх шари чередувались з еластичними ламелами. Клітинні елементи та волокна пухкої сполучної тканини зовнішнього шару мали класичну структуру.

У щурів, які отримували кальцитріол у дозі 1 мкг/кг на тлі введення NaHS , реєструвались помірні зміни судинної стінки (рис. 4.13. В, Г). Спостерігалось витончення середньої оболонки аорти, зменшення розмірів гладком'язових клітин на тлі ущільнення еластичних ламел. За умов застосування кальцитріолу у дозі 1 мкг/кг на тлі NaHS , на відміну від його ізольованого введення, в аорті щурів практично не виявлялось набряку та злущування ендотеліоцитів, зберігалась цілісність плазматичної мембрани, не виявлялось кальцифікатів у внутрішній та середній оболонках, не було просочування еритроцитів в стінку судини.

Таким чином, вплив ППГ та NaHS на мікроскопічний стан аорти щурів, які отримували кальцитріол у дозі 1 мкг/кг, продемонстрував суттєві відмінності. NaHS ефективно запобігав розвитку патологічних змін в аорті щурів, індукованих високою дозою $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$. Натомість при поєднанні ППГ з $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі 1 мкг/кг спостерігалось посилення вазотоксичного ефекту, що в цілому узгоджується зі змінами рівня ендотеліну-1 в сироватці крові.

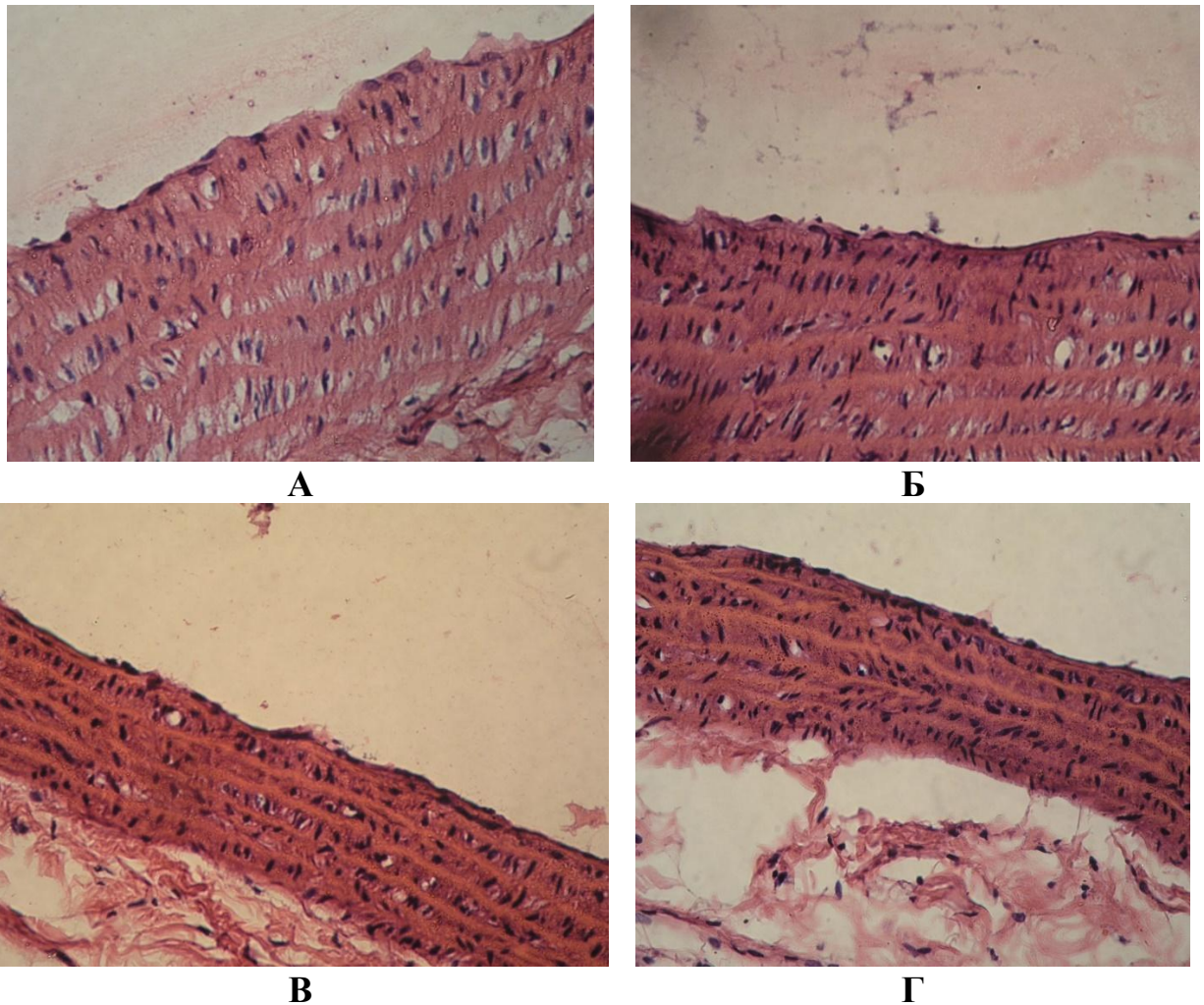


Рис. 4.13. Мікроскопічна організація грудної аорти дослідних щурів за дії кальцитріолу та донору NaHS. Примітки: А – NaHS, Б - 1,25 (ОН)₂D₃ 0,1 мкг/кг + NaHS, В, Г – 1,25 (ОН)₂D₃ 1 мкг/кг + NaHS. Забарвлення гематоксилін-еозином, × 400 (ок. 10, об. 40).

Отже, застосування кальцитріолу у високій дозі призводить до комплексу морфологічних змін в артеріях із пошкодженнями ендотеліальних клітин й стромальних елементів, що зумовлює негативні зміни у функціонуванні серцево-судинної системи. Модуляція стану системи H₂S/CSE є чинником, який модифікує вплив високих доз кальцитріолу на судинну стінку: дефіцит H₂S поглиблює ураження судинної стінки, у той час як підвищення рівня ендогенного H₂S справляє протилежний ефект. Кальцитріол у терапевтичному діапазоні концентрацій стримує вазотоксичний ефект інгібування синтезу H₂S.

Резюме. Модулятори системи H_2S / CSE впливають на реалізацію серцево-судинних ефектів кальцитріолу. ППГ суттєво поглиблює дефіцит H_2S в міокарді та аорті, індукований застосуванням високої дози $1,25 (OH)_2D_3$. Натомість, інгібіторний вплив ППГ на систему H_2S / CSE в серці та судинах зменшується при введенні кальцитріолу у фізіологічній дозі. Введення NaHS забезпечує помірне підвищення рівня ендogenousного H_2S в міокарді та аорті і зменшує депримууючий вплив високої дози кальцитріолу на систему H_2S / CSE. Модулятори обміну H_2S модифікують біохімічні зміни в міокарді, та аорті, індуковані високою дозою кальцитріолу: ППГ потенціює зростання рівнів медіаторів запалення та апоптозу (каспази-3, $TNF\alpha$), посилює дисбаланс протеїнів теплового шоку (Hsp70, Hsp60) та оксидативний стрес, стимулює зростання рівня ендотеліну-1. Натомість, $1,25 (OH)_2D_3$ у фізіологічній дозі зменшує біохімічні ознаки кардіотоксичної та вазотоксичної дії ППГ. Інгібування синтезу H_2S потенціює небажаний вплив високих доз $1,25 (OH)_2D_3$ на стан судин, про що свідчить поглиблення біохімічних та мікроскопічних ознак пошкодження ендотелію, потовщення внутрішньої еластичної мембрани та зміни гладком'язових клітин. Натомість, $1,25 (OH)_2D_3$ у терапевтичній дозі стримує формування дефіциту H_2S в аорті та зменшує ознаки вазотоксичної дії ППГ. Введення NaHS не викликає суттєвих змін показників міокарду та аорти щурів за дії фізіологічної дози $1,25 (OH)_2D_3$ і суттєво зменшує проапоптичний, прозапальний, вазотоксичний ефекти високої дози $1,25 (OH)_2D_3$.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [18, 19, 26, 24, 191, 15, 277]

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ КАЛЬЦИТРИОЛУ НА МЕДІАТОРИ УШКОДЖЕННЯ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ ЗА ДІЄТ-ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ В УМОВАХ МОДУЛЯЦІЇ СИСТЕМИ H_2S / CSE

Порушення забезпеченості вітаміном D та ожиріння є модифікованими факторами ризику серцево-судинної патології, що часто поєднуються між собою. Існують наукові докази, що прийом вітаміну D може запобігати розвитку кардіометаболічних порушень, зменшувати ендотеліальну дисфункцію та оксидативний стрес [253]. Однак, окремі клінічні дослідження не виявили впливу прийому вітаміну D на ризик кардіоваскулярних подій у дорослих осіб [202]. Тому встановлення нових біохімічних чинників, які можуть модифікувати серцево-судинні ефекти вітаміну D за ожиріння, залишається актуальним.

За результатами досліджень, що наведені у попередніх розділах, кальцитіол впливає на метаболізм H_2S в серці та судинах, з іншого боку модифікація стану системи H_2S впливає на кардіоваскулярні ефекти кальцитриолу. Завданням даного розділу було оцінити кардіопротекторну ефективність активної форми вітаміну D ($1,25(OH)_2D_3$) у щурів з дієт-індукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи H_2S / CSE. Слід відзначити, що кальцитіол був застосований лише у фізіологічній (терапевтичній) дозі 0,1 мкг/кг, оскільки у дозі 1 мкг/кг цей гормон гальмував синтез H_2S , спричиняв порушення мікроскопічного стану судин, ендотеліальну дисфункцію, прозапальні та проапоптотичні зміни у міокарді тварин. У той же час, кальцитриол у дозі 0,1 мкг/кг справляв помірний стимулюючий вплив на метаболізм H_2S і при ізольованому застосуванні не спричиняв суттєвих змін в експресії медіаторів запалення, апоптозу в серцево-судинній системі здорових щурів.

5.1. Вплив кальцитріолу на соматометричні параметри щурів з дієтіндукованим ожирінням в умовах модуляції системи H_2S / CSE

Як зазначено у розділі 2.1, ожиріння у тварин моделювали шляхом 10-тижневого застосування висококалорійної дієти (ВКД) з енергетичною цінністю 433,8 ккал на 100 г корму. Введення кальцитріолу та модуляторів рівня H_2S здійснювалось упродовж 9-го та 10-го тижнів дослідження щоденно. Тварини контрольної групи увесь термін перебували на стандартній дієті з енергетичною цінністю 271,6 ккал/ 100 г. У таблиці 3.1 наведено початкові та фінальні показники маси тіла, індексу маси тіла (ІМТ) та індексу Лі у тварин контрольної та дослідних груп. На початку експерименту всі групи тварин були репрезентативними за соматометричними показниками, натомість наприкінці дослідження були виявлені статистично значущі відмінності між тваринами контрольної та дослідних груп. Так, у тварин контрольної групи спостерігалось фізіологічне збільшення фінальної маси тіла (на 58,3 %, $p < 0,05$ відносно початкової маси), без суттєвих змін ІМТ та індексу Лі, що свідчить про пропорційне збільшення маси та довжини тіла тварин у процесі онтогенезу. У тварин групи 2 (ДІО) фінальна маса тіла збільшилась на 115% ($p < 0,001$), ІМТ – на 52,9 % ($p < 0,001$), індекс Лі – на 13,3 % ($p < 0,05$) відносно початкових показників. Порівняно з контролем у щурів групи 2 фінальні показники - маса тіла, ІМТ та індекс Лі були вищими на 36,9 ; 50,0 та 15,6 % ($p < 0,05$), що свідчить про досягнення стану ожиріння. В групі 3 (ДІО + 1,25 $(OH)_2D_3$) фінальні маса тіла, ІМТ, індекс Лі були вищими на 32,4; 39,2 та 11,9 % ($p < 0,05$) порівняно з групою контролю, що також свідчить про стан ожиріння. При цьому, слід відзначити, що ІМТ та індекс Лі в групі 3 виявились меншими (на 7,1 та 3,2 %, $p < 0,05$), ніж в групі 2. В групі 4 (ДІО + 1,25 $(OH)_2D_3$ + ППГ) фінальні маса тіла, ІМТ, індекс Лі були вищими на 41,6; 42,9 та 12,2 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем і не мали достовірних відмінностей порівняно з соматометричними параметрами в групі 2. В групі 5 (ДІО + 1,25 $(OH)_2D_3$ + NaHS) фінальні маса тіла, ІМТ, індекс Лі були вищими на 36,1; 39,3 та 10,8 %

($p < 0,05$) порівняно з контролем, при цьому ІМТ та індекс Лі виявились меншими (на 8,3 та 4,1 %, $p < 0,05$), ніж в групі 2.

Таблиця 5.1.

Соматометричні параметри щурів контрольної та дослідних груп на початку та у фіналі експерименту ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин ($n=8$)		Термін	Маса тіла, г	ІМТ, г/см ²	Індекс Лі, ум.од.
1	Контроль	1-й тиждень	173±3,4	0,52±0,01	0,302±0,002
		10-й тиждень	274±8,7 [§]	0,56±0,02	0,295±0,004
2	ДЮ	1-й тиждень	174 ±4,5	0,51±0,01	0,301±0,003
		10-й тиждень	375±11,9 ^{*§}	0,84±0,01 ^{*§}	0,341±0,002 ^{*§}
3	ДЮ + 1,25 (ОН) ₂ D ₃	1-й тиждень	177 ±4,3	0,51±0,01	0,302±0,003
		10-й тиждень	363±14,1 ^{*§}	0,78±0,01 ^{*#§}	0,330±0,001 ^{*#§}
4	ДЮ + 1,25 (ОН) ₂ D ₃ + ППГ	1-й тиждень	179 ±2,9	0,50±0,01	0,299±0,001
		10-й тиждень	388 ±15,1 ^{*§}	0,80±0,04 ^{*§}	0,331±0,007 ^{*§}
5	ДЮ + 1,25 (ОН) ₂ D ₃ + NaHS	1-й тиждень	180 ±2,6	0,51±0,01	0,299±0,001
		10-й тиждень	373±12,1 ^{*§}	0,77±0,02 ^{*#§}	0,327±0,004 ^{*#§}

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно групи 1;

2. # - $p < 0,05$ відносно групи 2;

3. § - $p < 0,05$ відносно стану «1-й тиждень» в кожній групі.

Таким чином, в усіх дослідних групах тривале застосування ВКД викликало аліментарне ожиріння. При цьому, двотижневе застосування 1,25 (ОН)₂D₃ та його поєднання з NaHS викликало тенденцію до сповільнення

розвитку ожиріння у тварин, що перебували на ВКД. При поєднаному застосуванні $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ і ППГ такої тенденції не спостерігалось.

Оцінка сумарної маси вісцерального жиру та індексу жирової маси підтвердила відмінності між контрольною групою, що увесь термін дослідження перебувала на стандартній дієті, та дослідними групами, що перебували на ВКД упродовж 10 тижнів (рис. 5.1.).

В умовах нашого експерименту, сумарна маса вісцерального жиру в групі контролю становила $8,14 \pm 0,22$ г, а в групі 2 (ДІО) була статистично значуще вищою (на 107 %, $p < 0,001$) і становила $16,9 \pm 0,71$ г, відповідно (див. рис. 5.1. А). В групах 3 (ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$), 4 (ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ +ППГ) та 5 (ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ +NaHS) маса жиру була вищою на 84,2; 116 та 79,3 % ($p < 0,001$), ніж в групі контролю. Виявилось, що в групах 3 та 5 сумарна маса вісцерального жиру була нижчою (на 11,2 та 13,6 %, $p < 0,05$), ніж в групі 2.

Оцінка індексу жирової маси підтвердила виявлені закономірності: в групі контролю цей показник становив $2,98 \pm 0,10$ ум.од., а в групі 2 (ДІО) був вищим на 51,0 % ($p < 0,05$) і становив $4,50 \pm 0,13$ ум.од. (див. рис. 5.1. Б). В групах 3, 4 та 5 індекс жирової маси був вищим на 40,3; 56,0 та 32,6 % ($p < 0,05$), ніж в контролі. При цьому, лише в групі 5 (ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ +NaHS) цей показник виявився статистично значуще нижчим на 12,2 % ($p < 0,05$), ніж в групі 2 (ДІО).

Таким чином, застосування кальцитріолу сповільнювало накопичення вісцерального жиру у щурів з ДІО. При введенні ППГ цей метаболічний ефект кальцитріолу нівелювався, у той час як при введенні NaHS ставав більш виразним. Отже, модуляція стану системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ може модифікувати терапевтичну ефективність активної форми вітаміну D за ожиріння.

На наступному етапі ми дослідили вплив кальцитріолу та його поєднання з модуляторами метаболізму H_2S на біохімічні медіатори та маркери ушкодження міокарду та аорти у щурів з ДІО.

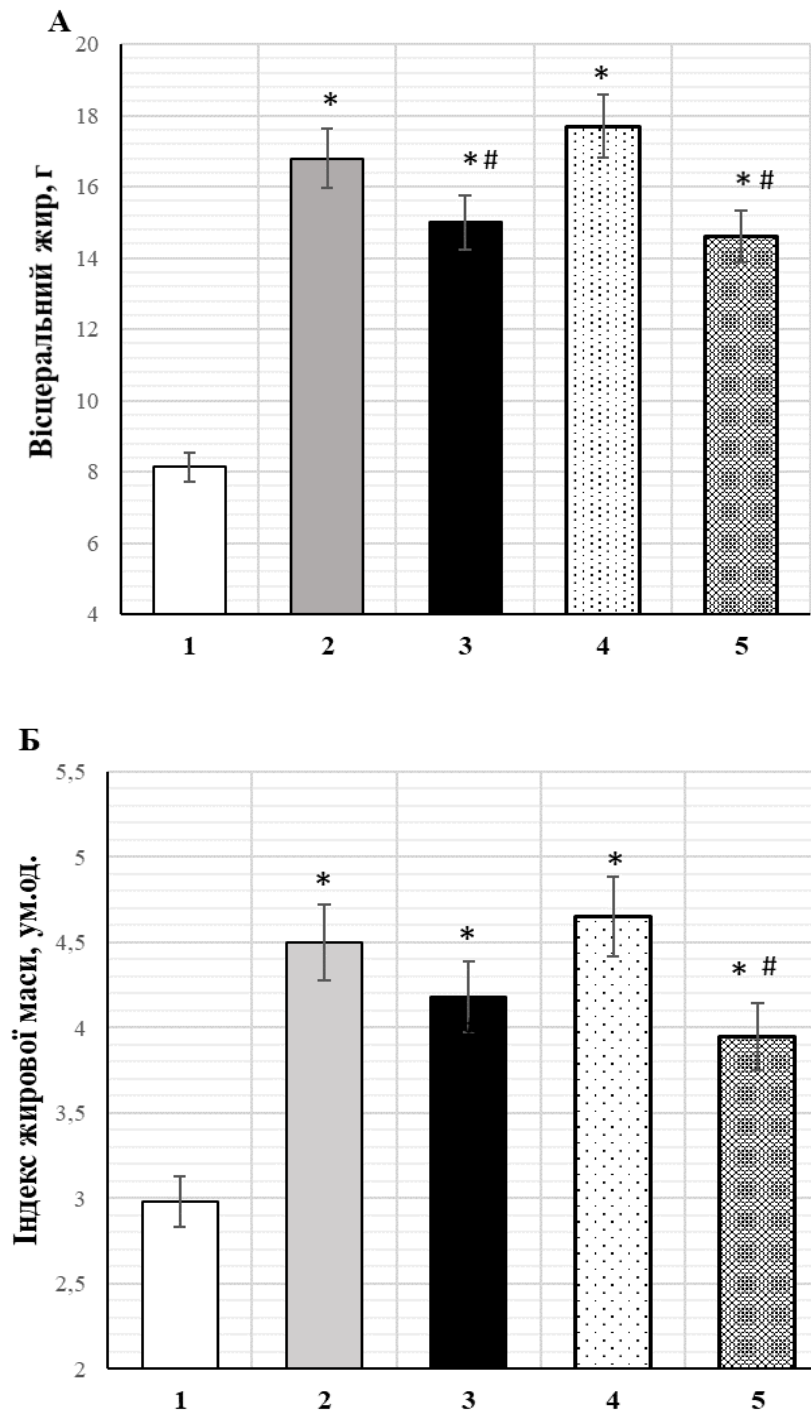


Рис. 5.1. Вміст вісцерального жиру та індекс жирової маси у щурів групи контролю та дослідних груп за дії кальцитріолу та модуляторів системи H_2S/CSE ($M \pm m$, $n=8$). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$; 4 - ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$ +ППГ; 5 - ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$ +NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - $p < 0,05$ відносно групи 2.

5.2. Вплив кальцитриолу на стан системи H_2S / CSE у щурів з дієтіндукованим ожирінням за дії модуляторів сульфідного обміну

Існують експериментальні докази, що ВКД викликає порушення сульфідного обміну та зниження рівня H_2S в серцево-судинній системі [Bobetska O. P.,2023]. Тому ми спочатку оцінили стан системи H_2S / CSE в міокарді та аорті щурів з ДІО в умовах ізольованого застосування кальцитриолу та за його поєднання з ППГ та $NaHS$.

Результати наших досліджень підтвердили, що за умов 10-тижневого застосування ВКД в серцево-судинній системі щурів формується дефіцит H_2S (рис. 5.2.). У щурів групи 2 (ДІО) рівень цього медіатора був нижчим на 29,8 та 30,1 %, ($p < 0,001$) порівняно з групою контролю.

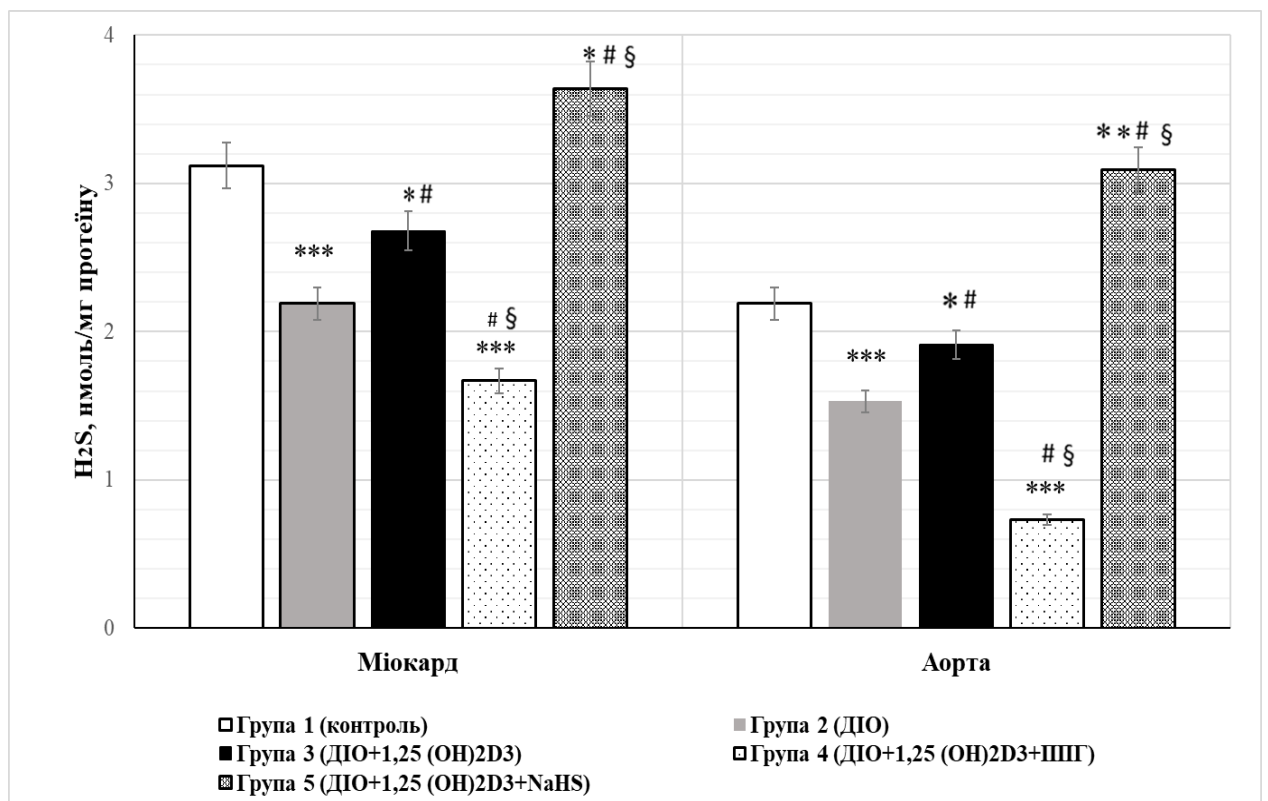


Рис. 5.2. Вплив $1,25 (OH)_2D_3$ на рівень H_2S в серцево-судинній системі щурів з дієтіндукованим ожирінням за дії модуляторів системи H_2S / CSE ($M \pm m$, $n=8$). Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно групи 1 (** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$); 2. # - $p < 0,05$ відносно групи 2; 3. § - $p < 0,05$ відносно групи 3.

Введення кальцитріолу запобігало зниженню рівня H_2S : у щурів в групі 3 (ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$) цей показник в міокарді та аорті був вищим на 22,3 та 24,8 % ($p<0,05$), ніж у щурів в групі 2. В групі 4 (ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$ +ППГ) рівень H_2S в міокарді та аорті виявився суттєво нижчим (на 46,4 та 66,7 %, $p<0,001$) порівняно з контролем і нижчим, ніж в групах 2 (на 23,7 та 52,3 %, $p<0,05$) та 3 (на 37,7 та 61,8 %, $p<0,05$), відповідно. Натомість, при сумісному застосуванні кальцитріолу та NaHS відбувалась нормалізація рівня H_2S : в групі 5 (ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$ +NaHS) цей показник в міокарді та аорті був достовірно вищим, ніж в групі 2 (на 66,2 та 102 %, $p<0,05$) та групі 3 (35,8 та 61,7 %, $p<0,05$).

Дослідження активності CSE підтвердило, що розвиток ожиріння, індукованого 10-тижневим застосуванням ВКД, асоціюється з пригніченням кардіоваскулярного синтезу H_2S (табл. 5.2.).

Таблиця 5.2.

Вплив 1,25 $(OH)_2D_3$ на активність цистатіонін- γ -ліази (CSE) в серцево-судинній системі щурів з дієтіндукованим ожирінням за дії пропаргілгліцину та NaHS ($M\pm m$, $n=8$)

Групи тварин (n=8)		Активність CSE, нмоль H_2S / хв·мг протеїну	
		міокард	аорта
1	Контроль	1,03±0,06	1,22±0,11
2	ДІО	0,75±0,07*	0,69±0,08*
3	ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$	0,98±0,08 [#]	1,02±0,09 [#]
4	ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$ + ППГ	0,58±0,02 ^{***#§}	0,79±0,07 ^{*§}
5	ДІО+1,25 $(OH)_2D_3$ + NaHS	1,14±0,06 [#]	1,47±0,19 ^{#§}

Примітки: 1. * - $p<0,05$ відносно групи 1 (** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$);

2. # - $p<0,05$ відносно групи 2;

3. § - $p<0,05$ відносно групи 3.

Так, у щурів групи 2 активність CSE в міокарді та аорті була нижчою на 27,1 та 43,4 % ($p < 0,05$) порівняно з групою контролю. Встановлено, що у щурів групи 3, що отримували $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$, в міокарді та аорті реєструвалась достовірно вища активність CSE (на 30,7 та 47,8 %, $p < 0,05$) порівняно з групою 2. У щурів групи 4, які отримували $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ та ППГ, активність CSE в міокарді та аорті виявилась нижчою (на 40,8 та 22,5 %, $p < 0,05$), ніж в групі 3. Натомість, у щурів групи 5, які отримували $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ та NaHS, активність CSE в міокарді та аорті практично відповідала показникам групи контролю і була вищою (на 52,0 та 113 %, $p < 0,05$), ніж в групі 2. Отже, за умов ДІО введення ППГ нівелювало стимулюючий вплив $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ на активність CSE, у той час, як введення NaHS, посилювало цей ефект.

На наступному етапі ми дослідили, як впливають модулятори системи H_2S / CSE на реалізацію протизапальних та антиапоптичних властивостей фізіологічної дози кальцитріолу за умов ожиріння.

5.3. Вплив кальцитріолу на медіатори запалення, апоптозу, маркери оксидативного стресу, ендотеліальної дисфункції у щурів з дієтіндукованим ожирінням в умовах модуляції системи H_2S / CSE

Встановлено, що 10-тижневе застосування ВКД стимулювало зростання у міокарді вмісту потужного прозапального цитокіну та індуктору апоптозу $\text{TNF}\alpha$: в групі 2 цей показник був вищим на 113 % ($p < 0,01$) порівняно з групою контролю (рис. 5.3.). Введення $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ стримувало підвищення міокардіального рівня $\text{TNF}\alpha$ за умов ДІО: у щурів групи 3 цей показник виявився статистично значуще нижчим на 33,7 % ($p < 0,05$), ніж у щурів в групі 2. Введення ППГ суттєво зменшувало протизапальну дію $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$: в групі 4 рівень $\text{TNF}\alpha$ в міокарді був достовірно вищим (на 22,8 %, $p < 0,05$), ніж в групі 3. Натомість, при поєднаному застосуванні $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ та NaHS спостерігалось посилення протизапального ефекту: міокардіальний рівень

TNF α в групі 5 був нижчим, ніж в групах 2 та 3 (на 49,9 та 24,4 %, $p < 0,05$), відповідно.

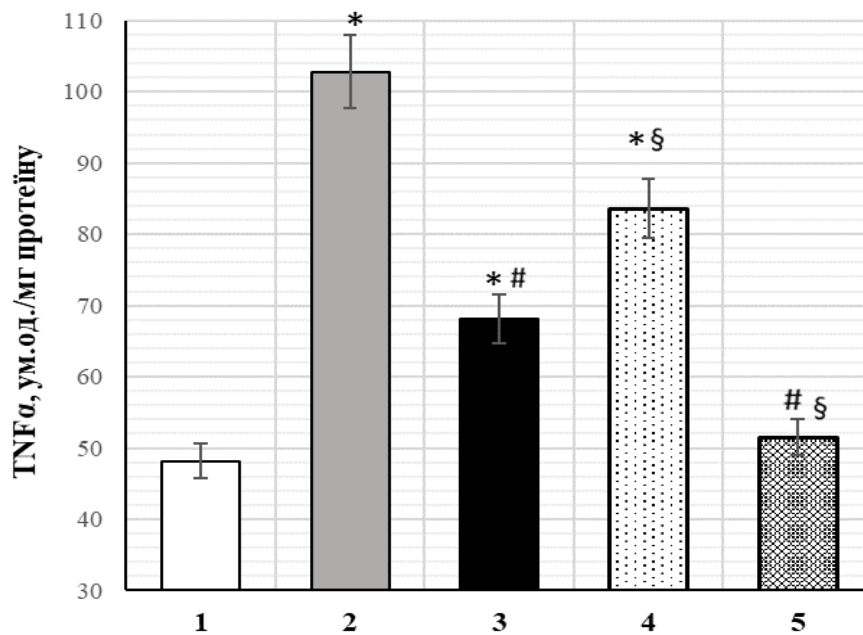


Рис. 5.3. Вплив 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ на рівень TNF α в міокарді щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи H $_2$ S/ CSE (M \pm m, n=8). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+1,25 (OH) $_2$ D $_3$; 4 - ДІО+1,25 (OH) $_2$ D $_3$ +ППГ; 5 - ДІО+1,25 (OH) $_2$ D $_3$ +NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

Отже, в умовах дефіциту H $_2$ S за дії селективного інгібітору CSE протизапальний ефект кальцитріолу погіршується, а за дії NaHS, навпаки, підсилюється. Зазначене може свідчити про безпосередню участь H $_2$ S-залежного сигналіngu у реалізації впливу кальцитріолу на міокардіальну експресію TNF α за умов ДІО.

Встановлено, що 10-тижневе застосування ВКД викликало статистично значуще зростання рівня ефекторної каспази-3 в міокарді щурів (рис. 5.4.). Так, у щурів групи 2 міокардіальний рівень каспази-3 був вищим на 63,1 % ($p < 0,01$), ніж в групі контролю. Застосування 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ запобігало підвищенню рівня каспази-3 в міокарді: у щурів в групі 3 цей показник був нижчим на

26,5 % ($p < 0,05$), ніж в групі 2. Введення ППГ зменшувало антиапоптичний ефект кальцитріолу: міокардіальний рівень каспази-3 в групі 4 був вищим на 27,9 % ($p < 0,05$), ніж в групі 3, і суттєво не відрізнявся від такого в групі 2 ($p > 0,5$). Натомість, введення NaHS потенціювало антиапоптичний ефект кальцитріолу: в групі 5 рівень каспази-3 у міокарді був статистично значуще нижчим порівняно з групою 2 (на 43,5 %, $p < 0,001$) та групою 3 (на 23,1 %, $p < 0,001$), і практично не відрізнявся від такого в контролі.

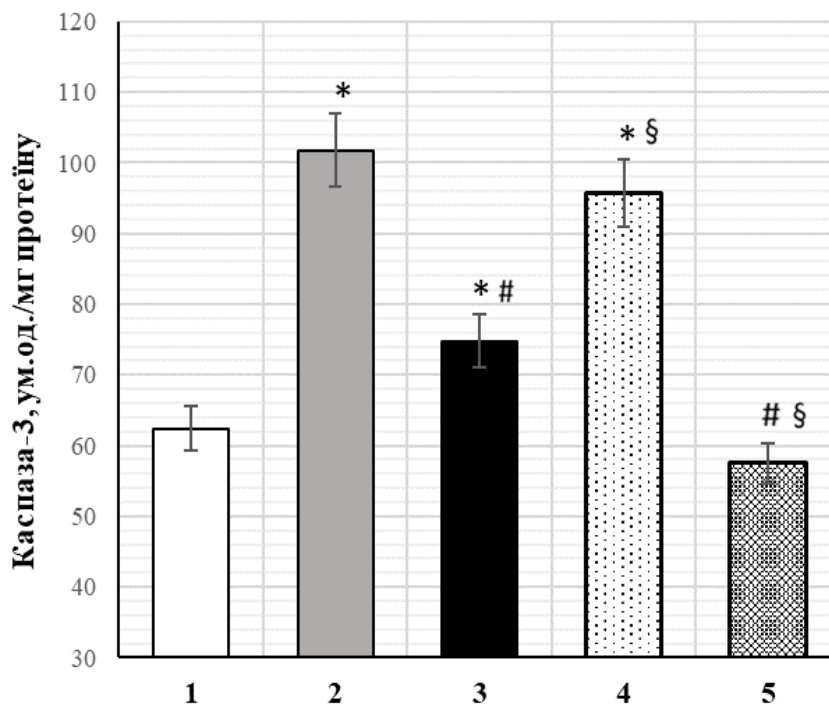


Рис. 5.4. Вплив $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ на рівень каспази-3 в міокарді щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ ($M \pm m$, $n=8$). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$; 4 - ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ +ППГ; 5 - ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ +NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

Таким чином, модуляція стану системи $\text{H}_2\text{S} / \text{CSE}$ впливає на антиапоптичний ефект фізіологічної дози кальцитріолу за умов ДІО. В умовах дефіциту H_2S проапоптична дія ВКД буде посилюватись, у той час, як

підвищення насиченості міокарду ендогенним H_2S може посилювати інгібуючий вплив кальцитріолу на процеси апоптозу в кардіоміоцитах.

Встановлено, що 10-тижневе застосування ВКД спричинило зміни в експресії протеїнів теплового шоку в міокарді щурів (рис. 5.5., 5.6.). Зокрема, у щурів в групі 2 (ДІО) реєструвалось підвищення рівня проапоптичного протеїну Hsp60 (на 34,3 %, $p < 0,01$) і зниження рівня кардіопротективного протеїну Hsp70 (на 20,7 %, $p < 0,05$) порівняно з контролем. Введення $1,25 (OH)_2D_3$ сприяло нормалізації рівнів протеїнів теплового шоку в міокарді тварин з ДІО: в групі 3 рівень Hsp60 був нижчим на 17,8 % ($p < 0,05$), а рівень Hsp70 був вищим на 23,9 % ($p < 0,05$) порівняно з відповідними показниками в групі 2.

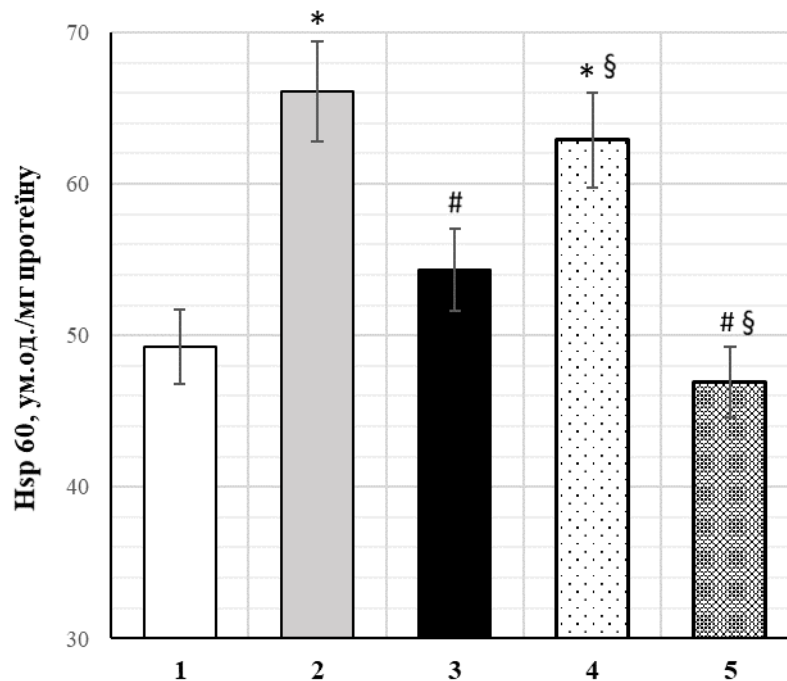


Рис. 5.5. Вплив $1,25 (OH)_2D_3$ на рівень протеїну теплового шоку Hsp60 в міокарді щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи H_2S / CSE ($M \pm m$, $n=8$). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+ $1,25 (OH)_2D_3$; 4 - ДІО+ $1,25 (OH)_2D_3$ +ППГ; 5 - ДІО+ $1,25 (OH)_2D_3$ +NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

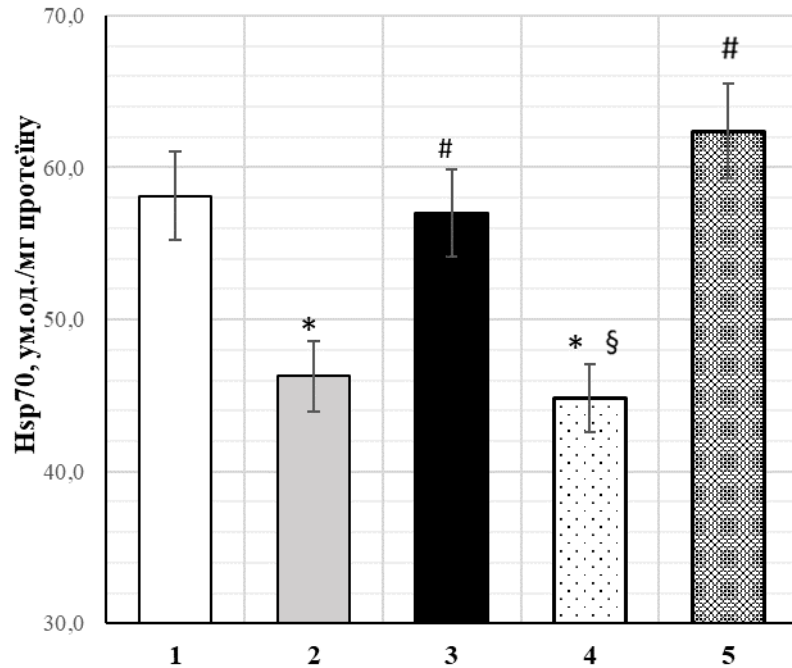


Рис. 5.6. Вплив $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на рівень протеїну теплового шоку Hsp70 в міокарді щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ ($M \pm m$, $n=8$). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; 4 - ДІО+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +ППГ; 5 - ДІО+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

Введення ППГ зменшувало коригуючий ефект кальцитріолу щодо протеїнів теплового шоку в міокарді щурів з ДІО, натомість введення NaHS навпаки його посилювало. Так, в групі 4 рівень Hsp60 в міокарді був вищим на 15,8 % ($p < 0,05$), а рівень Hsp70 був нижчим на 21,4 % ($p < 0,05$), ніж в групі 3, крім того ці показники не суттєво відрізнялись від таких в групі 2. У той же час, в групі 5 рівень Hsp60 був достовірно нижчим (на 29 %, $p < 0,001$), а рівень Hsp70 вищим (на 34,8 %, $p < 0,05$) порівняно з групою 2.

Встановлено, що довготривале застосування ВКД викликало розвиток дисбалансу в системі міокардіальних протеїнів теплового шоку (рис. 5.7.). Так, у щурів групи 2 (ДІО) коефіцієнт Hsp70/ Hsp60 становив $0,71 \pm 0,03$ ум.од., що було нижчим на 40,8 % ($p < 0,05$) порівняно з показником $1,20 \pm 0,07$ ум. од. групи контролю.

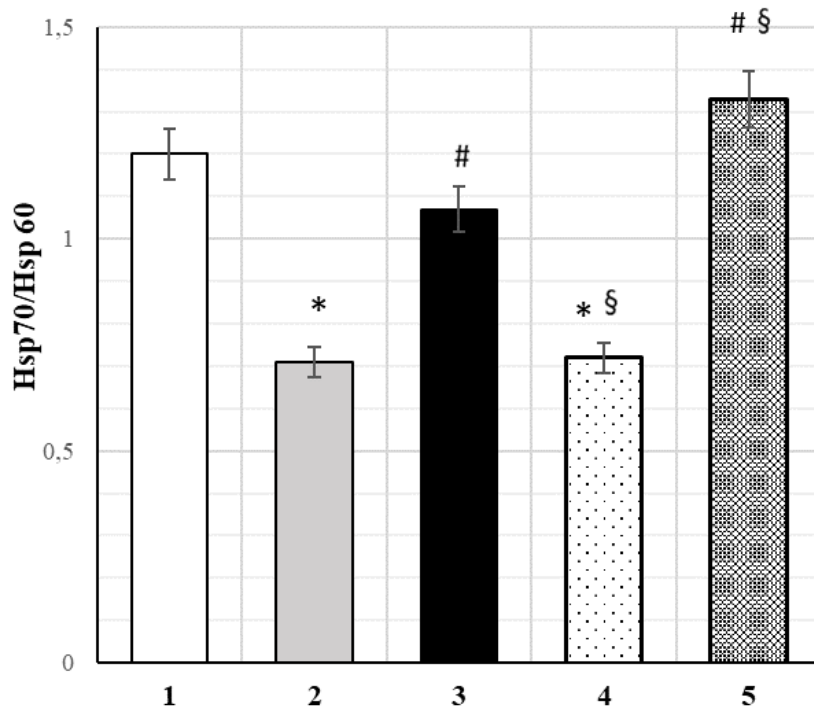


Рис. 5.7. Вплив 1,25 (OH)₂D₃ на коефіцієнт Hsp70 / Hsp60 в міокарді щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи H₂S/ CSE (M±m, n=8). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+1,25 (OH)₂D₃; 4 - ДІО+1,25 (OH)₂D₃+ППГ; 5 - ДІО+1,25 (OH)₂D₃+NaHS; 2) * - p<0,05 відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

Застосування кальцитріолу нормалізувало співвідношення протеїнів теплового шоку в міокарді щурів з ДІО: в групі 3 коефіцієнт Hsp70 / Hsp60 становив 1,07±0,09 ум.од. і був достовірно вищим, ніж в групі 2 (на 50,7 %, p<0,05). Введення ППГ нівелювало коригуючий вплив кальцитріолу на міокардіальні протеїни теплового шоку: в групі 4 коефіцієнт Hsp70 / Hsp60 був достовірно нижчим (на 32,7 %, p<0,05), ніж в групі 3. Натомість, при поєднанні кальцитріолу з NaHS спостерігалось відновлення нормального балансу в системі Hsp70 / Hsp60 у міокарді: в групі 5 цей коефіцієнт був достовірно вищим, ніж в групі 2 (на 90,2 %, p<0,001) та групі 3 (на 26,2 %, p<0,05). Таким чином, застосування кальцитріолу може забезпечувати цитопротекцію міокарду шляхом коригування рівнів протеїнів теплового шоку, і, відповідно,

стримувати розвиток ЕПР-стресу та сприяти нормалізації протеостазу за умов ожиріння.

Як відомо, розвиток ожиріння супроводжується оксидативним стресом [200]. Результати наших досліджень підтвердили, що 10-тижневе застосування ВКЛ викликало у тварин групи 2 підвищення рівня МДА та карбонільних груп протеїнів (на 63,8 та 70,1 %, $p < 0,01$) порівняно з контролем, що свідчить про посилення процесів вільно-радикального окиснення ліпідів та протеїнів (рис. 5.8., 5.9.). Введення $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ достовірно зменшувало ознаки оксидативного стресу в міокарді: у щурів групи 3 рівні МДА та карбонільних груп були достовірно нижчими (на 30,9 та 28,9 %, $p < 0,05$), ніж в групі 2.

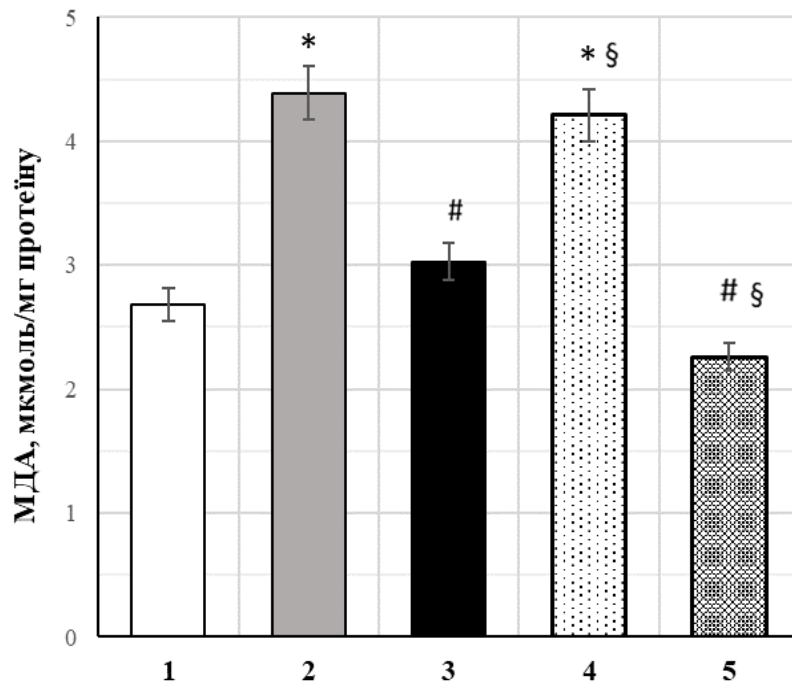


Рис. 5.8. Вплив $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ на рівень малонового діальдегіду (МДА) в міокарді щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) в міокарді щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ ($M \pm m$, $n=8$). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$; 4 - ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ +ППГ; 5 - ДІО+ $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ +NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

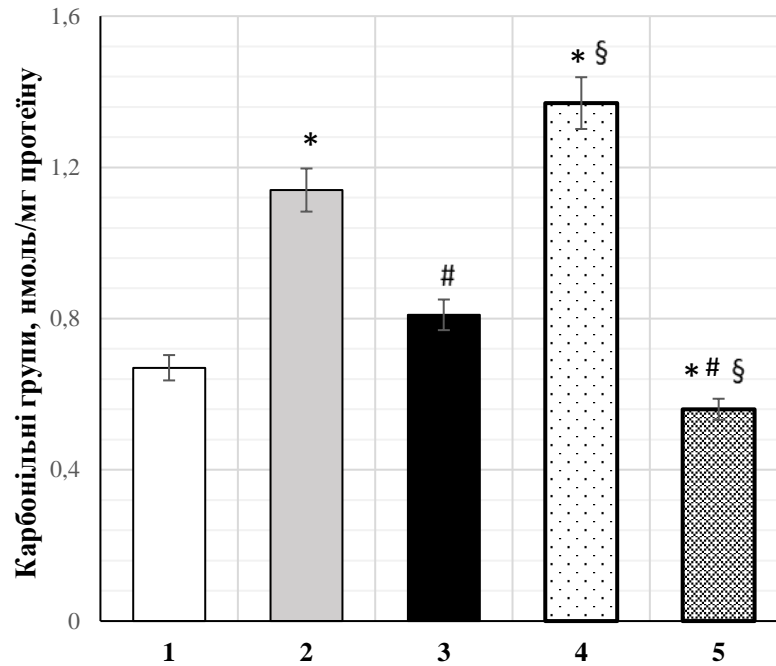


Рис. 5.9. Вплив 1,25 (OH)₂D₃ на рівень карбонільних груп протеїнів в міокарді щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) в міокарді щурів з дієт-індукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи H₂S/ CSE (M±m, n=8). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+1,25 (OH)₂D₃; 4 - ДІО+1,25 (OH)₂D₃+ППГ; 5 - ДІО+1,25 (OH)₂D₃+NaHS; 2) * - p<0,05 відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

Введення ППГ суттєво зменшувало антиоксидантний ефект кальцитріолу за умов ДІО: в групі 4 рівні МДА та карбонільних груп були достовірно вищими (на 38,9 та 69,1 %, p<0,05), ніж в групі 3. Натомість, за сумісного застосування NaHS та 1,25 (OH)₂D₃ ознаки оксидативного стресу в міокарді щурів з ДІО зменшувались більш суттєво: у групі 5 рівні МДА та карбонільних груп виявились нижчими (на 25,4 та 30,8 %, p<0,05), ніж в групі 3. Отже, система H₂S/ CSE залучена до реалізації антиоксидантної дії кальцитріолу і порушення її стану можуть модифікувати кардіопротекторний ефект вітаміну за ожиріння.

Як було зазначено раніше, ВКД справляє депримуєчий вплив на продукування H₂S в аорті щурів, що може негативно впливати на стан

судинного ендотелію. Тому на наступному етапі ми оцінили рівень ендотеліну-1 в сироватці крові щурів з ДІО за дії кальцитріолу та модуляторів обміну H_2S (рис. 5.10.). Нами було засвідчено, що 10-тижневе застосування ВКД спричинило розвиток ендотеліальної дисфункції, про що свідчить зростання рівня ендотеліну-1 в сироватці крові щурів групи 2 (на 105 %, $p < 0,001$), порівняно з контролем. Застосування кальцитріолу викликало помірне зниження сироваткового рівня ендотеліну-1 у щурів групи 3 (на 19,8 % $p < 0,05$), порівняно з групою 2.

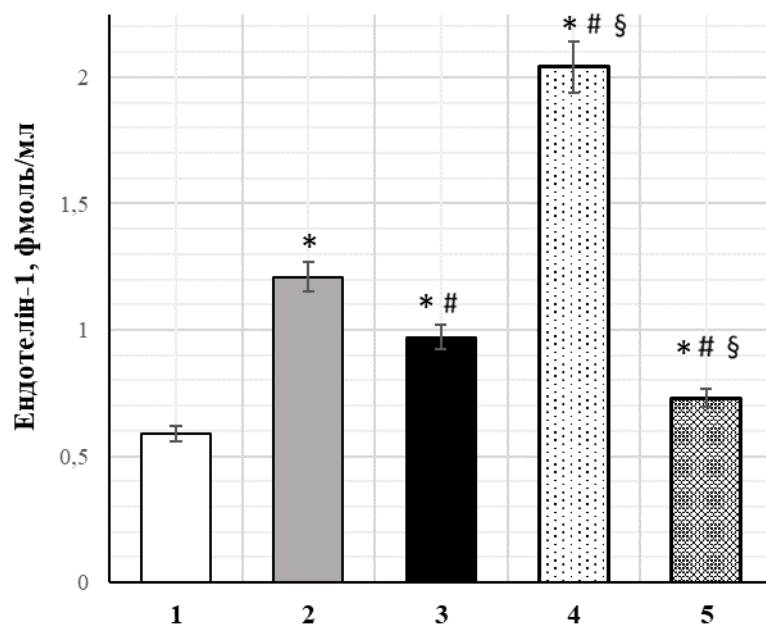


Рис. 5.10. Вплив $1,25 (OH)_2D_3$ на рівень ендотеліну-1 в сироватці крові щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) в міокарді щурів з дієт-індукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи H_2S/ CSE ($M \pm m$, $n=8$). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+ $1,25 (OH)_2D_3$; 4 - ДІО+ $1,25 (OH)_2D_3$ +ППГ; 5 - ДІО+ $1,25 (OH)_2D_3$ +NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

Введення ППГ нівелювало ендотеліопротекторний ефект кальцитріолу за умов ДІО: в групі 4 рівень ендотеліну-1 був вищим, ніж в групах 2 та 3 (на 68,6 та 110 %, $p < 0,01$), відповідно. Проте, введення NaHS суттєво підсилювало позитивний вплив кальцитріолу на судинний ендотелій: рівень ендотеліну-1 у щурів групи 5 був нижчим, ніж в групах 2 та 3 (на 39,7 та 24,7 %, $p < 0,01$). Отже,

модулятори системи H_2S/CSE модифікують вазопротекторну дію кальцитріолу за умов ДІО.

Одним із важливих кардіометаболічних чинників вважається зростання сироваткового рівня вісфатину - прозапального, проатерогенного адипокіну, що є чинником погіршення стану судинної стінки та оклюзії коронарних судин [266]. Результати наших досліджень засвідчили, що 10-тижневе застосування ВКД спричинило достовірне зростання рівня вісфатину в сироватці крові експериментальних тварин (рис. 5.10.). Так, в групі контролю рівень цього адипокіну становив $6,15 \pm 0,55$ нг/мл, у той час як в групі 2 (ДІО) - $11,9 \pm 0,67$ нг/мл і був достовірно вищим (на 93,5 %, $p < 0,001$), відповідно.

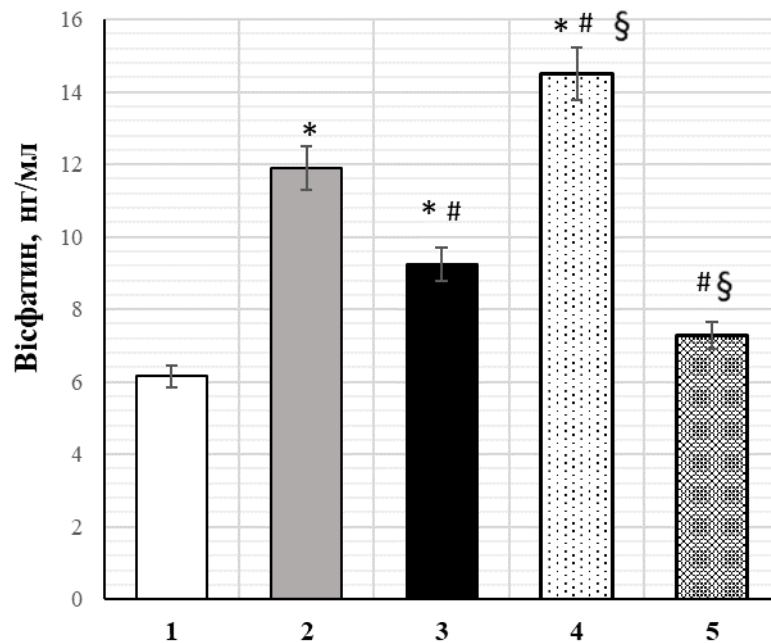


Рис. 5.11. Вплив $1,25(OH)_2D_3$ на рівень вісфатину в сироватці крові щурів з дієт-індукованим ожирінням (ДІО) за дії модуляторів системи H_2S/CSE ($M \pm m$, $n=8$). Примітки: 1) групи: 1 - контроль; 2 - ДІО; 3 - ДІО+ $1,25(OH)_2D_3$; 4 - ДІО+ $1,25(OH)_2D_3$ +ППГ; 5 - ДІО+ $1,25(OH)_2D_3$ +NaHS; 2) * - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - відносно групи 2; § - відносно групи 3.

Застосування кальцитріолу викликало статистично значуще зниження рівня вісфатину в сироватці крові щурів з ДІО (на 22,4 %, $p < 0,05$). Натомість, введення ППГ викликало підвищення рівня цього адипокіну у щурів з ДІО,

незважаючи на застосування кальцитріолу: в групі 4 він був вищим, ніж в групах 2 та 3 (на 21,8 та 56,9 %, $p < 0,05$), відповідно. При застосуванні NaHS коригуючий вплив кальцитріолу щодо рівня вісфатину, навпаки, посилювався: у щурів групи 5 цей показник був нижчим, ніж в групах 2 та 3 (на 38,8 та 21,2 %, $p < 0,05$).

Виявлені нами закономірності щодо впливу кальцитріолу та модуляторів стану системи H_2S/CSE на рівень вісфатину у щурів з ДЮ узгоджуються з описаними раніше змінами соматометричних параметрів, зокрема індексу жирової маси, що підтвердив і кореляційний аналіз (рис 5.12). Так, між рівнем вісфатину та індексом жирової маси виявлявся прямий кореляційний зв'язок ($r = 0,52$, $p < 0,01$).

Слід відзначити, що між сироватковим рівнем вісфатину та аортальним рівнем H_2S виявлявся сильний обернений кореляційний зв'язок ($r = -0,76$, $p < 0,001$), що є додатковим свідченням важливості системи H_2S/CSE в реалізації впливу кальцитріолу на кардіометаболічні чинники за умов ДЮ (рис. 5.13.).

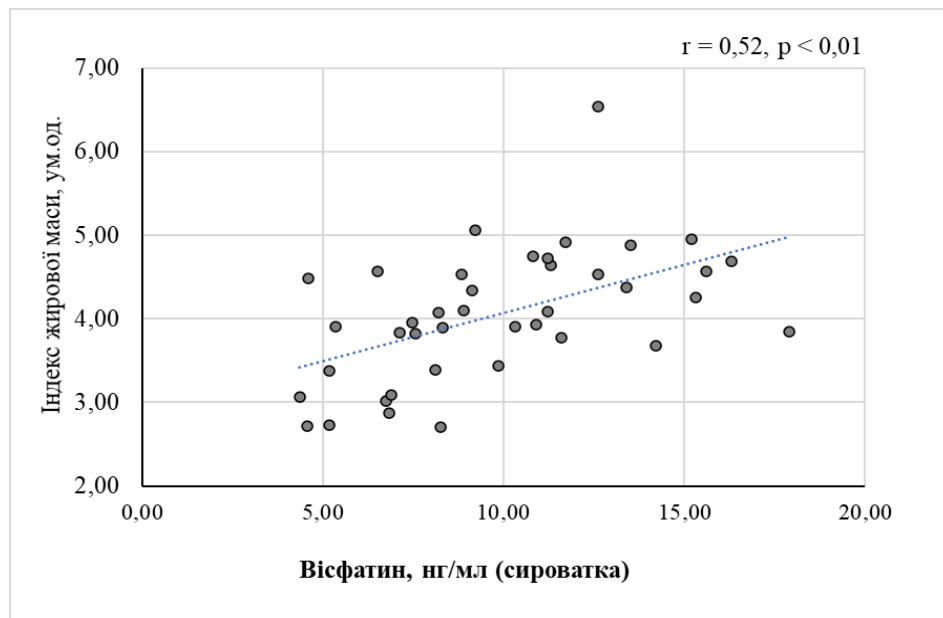


Рис. 5.12. Кореляційна залежність між рівнем вісфатину в сироватці крові та індексом жирової маси у щурів ($n=40$, r -Pearson).

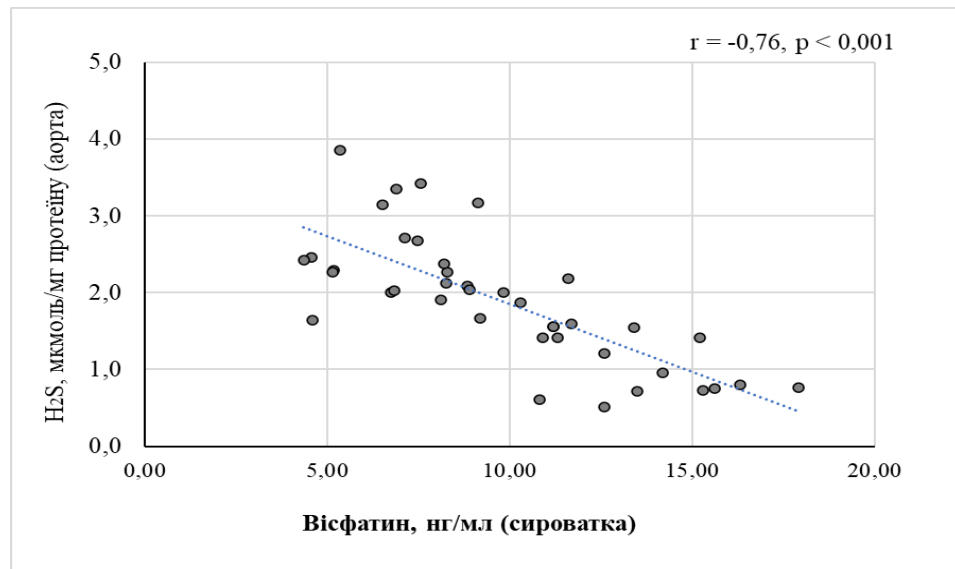


Рис. 5.13. Кореляційна залежність між рівнем вісфатину в сироватці крові та рівнем H₂S в аорті щурів (n=40, r-Pearson).

Резюме. Кальцитріол відіграє важливу роль в регуляції рівня H₂S в серцево-судинній системі за умов ожиріння і система H₂S/CSE дотична до реалізації кардіо- та ендотеліопротекторної дії активної форми вітаміну D₃. Модифікація стану системи H₂S/CSE впливає на біологічні ефекти кальцитріолу у кардіоміоцитах та ендотеліоцитах, що засвідчують зміни клітинних медіаторів апоптозу, запалення. В умовах інгібування системи H₂S/CSE за ожиріння поглиблення дефіциту H₂S в міокарді та аорті асоціюється з суттєвим зниженням протизапальної, антиапоптичної, антиоксидантної дії кальцитріолу. Підвищення рівня H₂S в серцево-судинній системі при введенні NaHS суттєво посилює кардіо- та ендотеліопротекторну дію кальцитріолу, що реалізується через вплив на клітинні медіатори апоптозу та запалення (TNF α , каспазу-3, Hsp70, Hsp60), продукування ендотеліну-1 та вісфатину, процеси вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів. Таким чином, H₂S-залежний сигналінг інтегрований в реалізацію біологічних ефектів кальцитріолу в серцево-судинній системі за умов ожиріння і подальше дослідження молекулярних механізмів такої взаємодії є перспективним напрямком подальших досліджень в галузі біологічної хімії та біології.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [23, 25, 190, 27, 22]

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Результати експериментальних та клінічних досліджень засвідчують плейотропність позакісткових метаболічних та фізіологічних ефектів вітаміну D, що реалізуються через його активну форму – 1,25-дигідроксивітамін D або кальцитріол [244; 65; 245]. Особливу увагу науковців привертають кардіоваскулярні ефекти кальцитріолу, оскільки в кардіоміоцитах, судинному ендотелії, серцевих фібробластах виявлена експресія рецепторів вітаміну D (VDR) [142; 64] та ензимів (CYP27B1, CYP24A1), які шляхом гідроксилювання перетворюють 25-гідроксивітамін D у гормон кальцитріол чи неактивний метаболіт 24,25-дигідроксивітамін D [64].

За сучасними уявленнями, недостатність вітаміну D розглядається як незалежний модифікований фактор ризику артеріальної гіпертензії, коронаросклерозу, інфаркту міокарду, метаболічного синдрому [244; 142; 28]. Існують дані, що через рецептори VDR кальцитріол безпосередньо впливає на продукцію вазоконстрикторів та вазодилататорів [147; 38]. Зокрема, нокаут гена VDR спричиняє підвищення активності ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) [147] та інгібування системи eNOS/NO у мишей [38]. З іншого боку, надлишкове надходження вітаміну D в організм також погіршує функціональний стан серцево-судинної системи, нирок, шлунково-кишкового тракту [170; 179] через вплив на кальцієво-фосфорний обмін, судинну кальцифікацію, гіперпродукцію реніну з активацією РААС, активацію імунозапальних процесів [130; 73; 194]. Експериментально засвідчено, що кальцифікація атеросклеротичних бляшок в судинах посилюється як за умов дефіциту вітаміну D, і за умов його надлишку [84]. Вживання надвисоких доз вітаміну D викликає кальцифікацію та запалення судинної стінки [250], що однак спостерігається і за його дефіциту.

Результати клінічних досліджень щодо ролі гіповітамінозу D у розвитку серцево-судинної патології виявились досить суперечливими [202].

Наприклад, за даними великого клінічного дослідження Mendelian не виявлено чіткої залежності між низьким сироватковим рівнем 25-гідроксिवітаміну D та ішемічною хворобою серця [164]. В іншому дослідженні засвідчено, що прийом вітаміну D та підвищення сироваткового рівня (25-ОН)D (25-гідроксивітаміну D) вище 20 нг/мл достовірно зменшує ризик смертності від усіх причин, а стійке підвищення рівня (25-ОН)D вище 30 нг/мл зменшує ризик інфаркту міокарду [28]. У більш масштабних дослідженнях (VITAL, VIDA та ін.) не виявлено зниження ризику кардіоваскулярних подій у дорослих осіб при прийомі вітаміну D [202].

Невиключено, що кардіоваскулярні ефекти вітаміну D можуть суттєво модифікуватись за дії певних екзогенних чи ендогенних чинників. Зокрема, в серці та судинах активно відбувається обмін сірковмісних амінокислот і синтезується мала газова молекула - H_2S , яка володіє вазорегулюючим, кардіопротекторним, антиоксидантним, антифіброзним потенціалом [126]. На теперішній час, інформація щодо ролі вітаміну D в регуляції метаболізму H_2S у різних органах і тканинах в нормі і, особливо, за різних патологічних станів є обмеженою. В окремих експериментальних дослідженнях показаний зв'язок між вітаміном D та H_2S [270; 258]. Так, у неорганічного донору H_2S - NaHS відмічена здатність зменшувати індуковану вітаміном D та ніотином кальцифікацію судин [270], натомість у вітаміну D виявлена здатність підвищувати рівень H_2S в серці здорових тварин [258].

Одним із найбільш розповсюджених патологічних станів, що асоціюється з дефіцитом вітаміну D є ожиріння [249]. При ожирінні також відмічаються порушення метаболізму сірковмісних амінокислот (цистеїну, гомоцистеїну), що є субстратами для ензиматичної продукції H_2S [153; 273] і, власне зміни обміну H_2S серці, нирках, жировій тканині [3; 1; 129; 68]. При цьому, зв'язок між активною формою вітаміну D та H_2S -залежною сигнальною системою за ожиріння не визначений. Гіпотетично, порушення сульфідного обміну можуть модифікувати біологічні ефекти вітаміну D в серцево-судинній

системі і впливати на його кардіопротекторні властивості, однак детальних досліджень в цьому напрямку не проводилось.

Тому метою дисертаційного дослідження було встановити роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів та механізмах H_2S -залежної кардіопротекції за ожиріння в експерименті.

Досліди виконані на 235 білих лабораторних щурах-самцях популяції Вістар із дотриманням принципів біоетики відповідно до Директив Ради Європи (Directive 2010/63/EU), інших міжнародних і вітчизняних нормативно-правових актів, що засвідчено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Дослідження було проведено в три основні етапи: 1) вивчення впливу кальцитріолу ($1,25(OH)_2D_3$) у фізіологічній та високій дозі на показники метаболізму H_2S та експресію гена *CSE* в серцево-судинній системі щурів; 2) дослідження впливу кальцитріолу на медіатори запалення, апоптозу, маркери оксидативного стресу в міокарді, сироваткові маркери дисфункції ендотелію, морфологічний стан аорти за умов модуляції стану системи H_2S / *CSE*; 3) оцінка кардіопротекторного ефекту кальцитріолу за умов ожиріння, індукованого висококалорійною дієтою з високим вмістом жирів, в умовах модуляції рівня ендogenous H_2S .

В дисертаційному дослідженні застосовували кальцитріол в дозах 0,1 мкг/кг та 1,0 мкг/кг упродовж 14-ти та 28-ми діб (внутрішньошлунково 1 раз на 2 доби). Вибір доз і режиму введення гормону ґрунтувався на ретельному аналізі літератури, який засвідчив значну варіативність дозування кальцитріолу в експериментах на лабораторних щурах - від 0,03 до 30 мкг/кг [213; 161]. Також істотно варіювали загальні терміни та режими застосування кальцитріолу. Наприклад, в роботі Yi Yin et al. (2012) $1,25(OH)_2D_3$ вводили щурам у дозах 1,0; 2,5; 5 мкг/кг внутрішньоочеревинно кожні 2 доби упродовж 8 тижнів (з метою корекції порушень ліпідного метаболізму за умов високожирової дієти) [272]. Ma R. et al. (2016) вводили кальцитріол у дозі 0,03 мкг/кг (в/шл на арахісовій олії) 1 раз на добу упродовж 6 тижнів (для зменшення метаболічних розладів у щурів із цукровим діабетом 2 типу) [161].

Кальцитріол у дозах 33,3, 100, 300, 900 нг/кг вводили в/шл 1 раз на добу 5 раз на тиждень упродовж 12 тижнів (для вивчення впливу на процеси ремоделювання трабекулярних кісток у щурів) [213]. Safari F. et al. (2015) засвідчено, що застосування кальцитріолу в дозі 0,01 мкг/кг 3 рази на тиждень упродовж 3-х місяців не виявляє кардіопротекторного ефекту при ішемічно/реперфузійному ураженні міокарду у щурів; застосування кальцитріолу в дозі 1 мкг/кг 3 рази на тиждень упродовж 1 місяця викликало втрату маси тіла та коливання артеріального тиску [212]. Кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг не впливав на гемодинамічні параметри і на рівень кальціємії [212; 78]. Автори назвали цю дозу «некальціємічною» (“non-calcemic”) і «негіпотензивною» (“non-hypotensive”), що дозволяє умовно вважати її фізіологічною і терапевтичною. Спираючись на вищевикладене нами були застосовані 2 дози кальцитріолу: «фізіологічна» - 0,1 мкг/кг та «висока» - 1 мкг/кг із режимом введення 1 раз на 48 годин упродовж 4-х тижнів, які не викликали загибелі тварин упродовж експерименту.

Нами було встановлено, що введення кальцитріолу викликає зміни показників метаболізму H_2S в серці та грудній аорті здорових статевозрілих щурів-самців із певними відмінностями залежно від терміну досліду та застосованої дози. Фізіологічна доза $1,25 (OH)_2D_3$ (0,1 мкг/кг) забезпечувала поступове зростання рівня H_2S в серцево-судинній системі щурів, що асоціювалось з помірним підвищенням активності H_2S -продукуючих ензимів (CSE, CAT/3-MST, TST) та H_2S -депонуючого ензиму (TrxR) станом на 28-му добу. У той же час, $1,25 (OH)_2D_3$ у надфізіологічній дозі (1 мкг/кг) спочатку справляв помітний стимулюючий ефект щодо H_2S -продукуючих ензимів і забезпечував підвищення рівня H_2S в аорті та міокарді у перші 2 тижні, але в подальшому спостерігалось падіння активності практично усіх досліджуваних ензимів сульфідного обміну і формувався дефіцит H_2S в серцево-судинній системі щурів. Депримуючий вплив високої дози кальцитріолу був найсильнішим щодо ензиму CSE, активність та експресія якого суттєво знижувались в аорті та міокарді, а найменш суттєвим - щодо сульфітоксидаза,

активність якої помірно знижувалась лише при тривалому введенні високої дози цього гормону. Зауважимо, що кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг не порушує фізіологічний баланс у різних ланках сульфідного метаболізму на тлі помірного стимулюючого ефекту (незалежно від терміну застосування). Натомість, при тривалому введенні високої дози кальцитріолу формується значний дисбаланс у шляхах CSE та CAT/3-MST, що підтверджується достовірним зниженням рівня мРНК *CSE / Actb* та коефіцієнту CSE / CAT в міокарді та аорті щурів.

Як було зазначено раніше, уперше вплив вітаміну D на концентрацію H_2S в тканинах тварин був описаний в роботі Wiliński B. et al. [258]. Автори показали, що введення вітаміну D3 у дозах 10000 МО та 40000 МО інтраперітонеально упродовж 5 днів викликало підвищення рівня H_2S в органах здорових мишей, при цьому найбільший бустерний ефект реєструвався в серці, і менш виразний – в мозку та нирках [258]. Існують дані, що кальцитріол в концентраціях 25 та 50 нмоль підвищував активність CSE та посилював формування H_2S в культурі адипоцитів, передінкубованих з глюкозою [163]. Кальцитріол стимулював продукцію H_2S в культурі шванівських клітин щурів, що попереджало нейротоксичний ефект високого рівня глюкози та метилглюкосу [281]. Також в культурі ізольованих кардіоміоцитів кальцитріол (0,4 та 1 мкг/мл) зменшував ознаки мітохондріальної дисфункції та оксидативного стресу, ініційованих алюміній фосфідом [101]. Активність CSE може регулюватись внутрішньоклітинним рівнем кальцію і цей ефект не опосередковується через кальмодулін, але до певної міри залежить від наявності ПАЛФ [177]. В присутності ПАЛФ CSE-залежний синтез H_2S активується низьким рівнем Ca^{2+} і гальмується високим рівнем Ca^{2+} ; за ПАЛФ десульфуразна активність CSE пригнічується високим рівнем Ca^{2+} і також зменшується за низьких концентрацій Ca^{2+} [177]. Молекулярний механізм цього явища залишається невизначеним. Також потребують уточнення механізми впливу кальцитріолу на експресію CSE в серцево-судинній системі, що спостерігалось у нашому дослідженні.

Гіпотетично, такий вплив вітаміну D може реалізуватись через модифікацію активності гістондеацетилаз та ДНК-метилтрансфераз [217]. Адже встановлено, що кальцитріол інгібує експресію гістондеацетилаз [217], а інгібітори активності гістондеацетилази (HDAC6) підвищують експресію CSE в культурі ендотеліальних клітин людини [146]. Механізми впливу кальцитріолу на активність інших ензимів сульфідного обміну залишаються маловідомими. З даними Mikami Y. et al. [176], що утворення H_2S за участі CAT/3-MST також контролюється рівнем кальцію: за високих рівнів Ca^{2+} активність CAT зменшується, натомість активність 3-MST не змінюється. Кальцитріол може впливати і на процес депонування H_2S через систему тіоредоксину та TrxR, оскільки посилює експресію протеїну TXNIP (інактиватору тіоредоксину) і стимулює оксидативний стрес в культурах клітинах *in vitro* [102; 133]. У той же час, кальцитріол може безпосередньо стимулювати експресію TrxR в присутності селену [220], а через активацію транскрипційного фактора Nrf2 - посилювати експресію антиоксидантних ензимів (TrxR, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, супероксиддисмутази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази), підвищувати рівень глутатіону та тіоредоксину [31].

Таким чином, кальцитріол залучений до регуляції обміну H_2S в серці та судинах. Відмінності впливу високих та фізіологічних доз кальцитріолу на систему H_2S можуть бути пов'язані зі змінами внутрішньоклітинної концентрації кальцію і з впливом на експресію генів ензимів транссульфурування, що засвідчують результати наших досліджень та описані вище факти, отримані іншими науковцями.

Коливання рівня H_2S в тканинах можуть впливати на реалізацію біологічної дії кальцитріолу. Тому на наступному етапі було оцінено вплив високих та фізіологічних доз кальцитріолу на медіатори запалення та апоптозу за різної насиченості серця та судин H_2S . Результати наших досліджень засвідчили, що інгібування активності CSE при введенні ППГ суттєво поглиблює патобіохімічні пертурбації в серці та судинах за дії

надфізіологічних концентрацій кальцитріолу, у той час як введення NaHS (неорганічного донору H_2S), навпаки їх зменшує. Значний дефіцит H_2S в міокарді та аорті за комбінованої дії високої дози $1,25 (OH)_2D_3$ з ППГ асоціюється з підвищенням рівнів ключових медіаторів запалення та апоптозу (каспази-3, $TNF\alpha$), розвитком дисбалансу в системі протеїнів теплового шоку (зниженням рівня антиапоптичного Hsp70, підвищенням рівня проапоптичного Hsp60, зниженням відношення Hsp70 / Hsp60, що може свідчити про ЕПР-стрес), поглибленням ознак оксидативного стресу та ендотеліальної дисфункції (зі збільшенням сироваткового рівня ендотеліну-1, відповідними морфологічними змінами в грудній аорті). З іншого боку, на тлі прийому фізіологічних доз кальцитріолу негативний вплив ППГ на систему H_2S / CSE в серці та судинах зменшувався, що очевидно пов'язано із стимулюючим впливом $1,25 (OH)_2D_3$ на різні ланки сульфідного обміну та антиоксидантним потенціалом (як зазначалось раніше). Підвищення рівня H_2S в серці та судинах при застосуванні NaHS суттєво зменшувало кардіо- та вазотоксичний ефект високої дози $1,25 (OH)_2D_3$, що підтверджує зниження рівнів каспази-3, $TNF\alpha$, нормалізація відношення Hsp70 / Hsp60 в міокарді, зниження рівня ендотеліну-1 в сироватці крові, менш виразні зміни мікроскопічного стану аорти. Введення NaHS на тлі фізіологічної дози $1,25 (OH)_2D_3$ не викликало патобіохімічних та морфологічних змін в серцево-судинній системі щурів, що асоціювалось з помірним підвищенням рівня насиченості міограду та аорти ендogenous H_2S . Зауважимо, що між рівнем H_2S та маркерами апоптозу, запалення та оксидативного стресу в міокарді щурів виявлялись обернені кореляційні зв'язки, при цьому найбільш сильні асоціації були з рівнем каспази-3 ($r_{sp} = -0,76, p < 0,001$) та $TNF\alpha$ ($r_{sp} = -0,61, p < 0,001$).

Як відомо, ендogenous H_2S є потужним антиоксидантом і формування його дефіциту в міокарді на тлі застосування надфізіологічної дози кальцитріолу може бути чинником дисфункції мітохондрій, стимулювати підвищення рівнів каспази-3, $TNF\alpha$, пригнічувати експресію АТФ-залежних шаперонів Hsp60, Hsp70. Натомість, цитопротекторний ефект фізіологічної

доза кальцитріолу може реалізуватись через здатність стимулювати синтез H_2S в серці та судинах. Отримані нами результати узгоджуються з іншими результатами інших дослідників. Так, апоптоз кардіоміоцитів, викликаний доксорубіцином, асоціювався зі зниженням синтезу H_2S та пригніченням експресії CSE, у той час як в присутності NaHS та при підвищенні експресії CSE спостерігався антиапоптичний ефект через полегшену інактивацію каспази-3 в культурі кардіоміоцитів [271]. Існують докази різноспрямованого впливу кальцитріолу на процеси апоптозу. Наприклад, в культурі ракових клітин кальцитріол посилював активність каспаз (3, 8, 9), активував апоптоз та пригнічував процеси проліферації [239; 275]. За інфаркту міокарду кальцитріол стимулював експресію VDR в кардіоміоцитах, інгібував сигнальний шлях NF- κ B та запальний процес, підвищував проліферативну активність клітин, що викликало кардіопротекторний ефект [269]. Кальцитріол в концентраціях 10 нМ та 100 нМ пригнічував секрецію прозапальних цитокінів (IL-6, TNF- α) та синтез Hsp70 в культурі гладеньких міоцитів судин на тлі теплового шоку [245]. В одному з досліджень показано, що шаперон Hsp70 регулює концентрацію рецепторів VDR в клітинах у [159]; потенціює адаптивний потенціал кардіоміоцитів за умов ішемії/реперфузії, запалення, оксидативного стресу та перевантаження кальцієм [231; 283], але при вивільненні з пошкоджених тканин у плазму крові цей протеїн набуває прозапальних властивостей [234; 138]. Hsp60 залучений до регуляції мітохондріального протеостазу, впливає на синтез АТФ, метаболічні процеси та клітинні функції [140]. При вивільненні з клітин Hsp60 стимулює синтез прозапальних цитокінів і діє як чинник ендотеліальної дисфункції [140]. Hsp60 взаємодіє з різними білками апоптозу, виявляє протиапоптичну та антиапоптичну дію, бере участь в активації прокаспази 3 у ефektorну каспазу-3 [60]. Вказані медіатори відіграють важливу роль механізмах ушкодження міокарду, ремоделювання серця та судин, розвитку серцевої недостатності. Зв'язок між системою H_2S та цитозольними шаперонами потребує подальшого вивчення. Гіпотетично, Hsp60 та Hsp70 можуть впливати на процеси фолдингу

та стабілізації ензимів сульфідного обміну. До прикладу, нокаут гена Hsp70 спричинив пригнічення продукування H_2S в епітелії ниркових каналців [256]. Підвищення рівня Hsp70 нормалізувало стан глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи та підвищувало стійкість нервових клітин до ішемії [42].

Таким чином, модуляція стану системи H_2S / CSE впливає на реалізацію кардіопротекторних властивостей вітаміну D, які опосередковуються через регуляцію рівнів сигнальних та ефекторних молекул (каспази-3, $TNF\alpha$, Hsp60, Hsp70).

Дефіцит вітаміну D часто асоціюється з ожирінням [142]. Відомо, що в експериментальних умовах кальцитріол справляє депримуючий вплив на ліпогенез та адипогенез через зниження експресії генів таких ензимів як синтаза жирних кислот, ацетил-КоА-карбоксилаза, стеароїл-КоА-десатураза в жировій тканині та печінці [125], пригнічує термінальні етапи адипогенезу та зменшує накопичення ліпідів в клітинах-мішенях, зменшує ознаки дисліпідемії, коригує рівень окремих адипокінів [241], стимулює синтез ендотеліального нітроген монооксиду через активацію експресії eNOS, підвищує експресію антиоксидантних ензимів тощо [254]. Вважається, що прийом вітаміну D може зменшувати ознаки ожиріння [99], знижувати ризик кардіоваскулярних ускладнень [28]. Прийом вітаміну D у пацієнтів з ожирінням викликав зниження рівні $TNF\alpha$, тригліцеридів, паратгормону, підвищував рівень ЛПВЩ [293].

Не виключено, що за умов ожиріння кардіопротекторний ефект вітаміну D може модифікуватись за дії різних чинників, зокрема на тлі порушень сульфідного обміну. Тому далі була проведена оцінка впливу кальцитріолу в «кардіопротекторній дозі» 0,1 мкг/кг на патобіохімічні зміни в серці та судинах за експериментального ожиріння в умовах модуляції рівня H_2S . На момент включення у дослідження всі групи тварин були репрезентативними за вихідними масо-ростовими параметрами, проте станом на 10-й тиждень виявлялись суттєві міжгрупові відмінності за масою тіла, ІМТ (приріст понад 20 % відносно вихідного рівня та показників групи контролю) та індексом Лі

(збільшення вище 0,310 ум.од.), які засвідчили стан ожиріння. Застосування 1,25 (OH)₂D₃ та його поєднання з NaHS викликало тенденцію до сповільнення розвитку ожиріння у тварин, які отримували ВКД, що не спостерігалось на тлі застосування ППГ. Більш виразні міжгрупові відмінності виявились при оцінці індексу жирової маси: застосування кальцитріолу стримувало приріст вісцерального жиру у щурів з ДІО, але цей метаболічний ефект зменшувався при введенні ППГ, у той час як при введенні NaHS ставав більш виразним. Розвиток ожиріння асоціювався зі зниженням рівня H₂S та пригніченням активності CSE в міокарді та аорті щурів, що узгоджується з результатами досліджень інших авторів [4; 51; 119]. Введення 1,25 (OH)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг зменшувало негативний вплив ВКД на сульфідний обмін, про що свідчить підвищення міокардіального та аортального рівня H₂S та активності CSE у тварин з ДІО. Цей ефект 1,25 (OH)₂D₃ практично нівелювався введенням ППГ, що проявлялось значним зниженням рівня H₂S в міокарді та аорті щурів з ДІО. Введення NaHS посилювало сприятливий вплив 1,25 (OH)₂D₃ на сульфідний обмін і відновлювало рівень H₂S та активність CSE в міокарді та аорті щурів з ДІО.

Довготривале застосування ВКД викликало підвищення рівня каспази-3, TNF α , Hsp60, зниження рівня Hsp70, підвищення рівнів продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів (МДА, карбонільних груп) в міокарді, а також спричиняло підвищення рівнів ендотеліну-1 та вісфатину в сироватці крові щурів. За цих умов, застосування 1,25 (OH)₂D₃ у дозі 0,1 мкг/кг зменшувало вказані патобіохімічні зміни - зменшувало рівні медіаторів запалення та апоптозу, прояви оксидативного стресу та ендотеліальної дисфункції. Модуляція стану системи H₂S/ CSE впливала на реалізацію серцево-судинних ефектів кальцитріолу за ожиріння, зокрема при введенні ППГ збергалось підвищення міокардіальних рівнів каспази-3, TNF α , Hsp60, МДА, карбонільних груп протеїнів та сироваткових рівнів ендотеліну-1 та вісфатину. Натомість, при поєднанні кальцитріолу з NaHS посилювався кардіопротекторний ефект, про що свідчило зниження міокардіальних рівнів

каспази-3, TNF α , відновлення балансу в системі протеїнів теплового шоку Hsp70/Hsp60, пригнічення оксидативного стресу, нормалізацію сироваткового рівня ендотеліну-1 та вісфатину.

Здатність NaHS потенціювати вплив кальцитріолу на розвиток ожиріння та його ускладнень може реалізуватись через різні молекулярні механізми, у тому числі через вплив на центральні ендокринні органи та периферичні тканини. Нещодавно було показано, що NaHS може безпосередньо впливати на нейрони гіпоталамусу і блокувати активацію сигнального шляху mTOR, IKK/NF- κ B за рахунок підвищення рівня H₂S та каталітичної активності CBS (цистатіонін- β -синтази) - ключового H₂S-синтезуючого ензиму в головному мозку і, таким чином, викликати зниження маси тіла за умов ожиріння, індукованого ВКД [288]. Донори H₂S, які можуть підвищувати його у мітохондріях, інгібують ліпогенез та запалення через блокування шляху mTOR/SREBP-1 і NF- κ B, і зменшують ВКД-індуковане ожиріння та стеатоз печінки у мишей [235]. Крім того, H₂S може запобігати ушкодженню серцево-судинної системи за ожиріння через вплив на ірисин-залежні метаболічні процеси [90]. Запалення, оксидативний стрес, дисадипокінемія є провідними тригерними чинниками прогресування ожиріння через стимуляцію проліферації преадипоцитів, посилення диференціювання адипоцитів і збільшення зрілих адипоцитів білої жирової тканини [200; 70]. Активні форми кисню (АФК) регулюють масу тіла, впливаючи на нейрони гіпоталамусу, які контролюють відчуття насичення і голоду [171]. У свою чергу, власне ожиріння промотує системний оксидативний стрес через численні біохімічні шляхи, наприклад через утворення супероксид-аніону НАДФН-оксидазами, аутоокислення гліцеральдегіду, активацію протеїніназ С та участь поліольних і гексозамінових шляхів, гіперлептинемію, порушення антиоксидантного захисту, постпрандіальну генерацію ROS [148]. Оскільки і кальцитріол, і H₂S підвищують антиоксидантний потенціал різних органів і тканин, що є особливо важливим за ожиріння, тому їх поєднання забезпечило найкращу метаболічну кардіопротекцію в нашому дослідженні.

Вісцеральна жирова тканина є активним продуцентом вісфатину - прозапального, проатерогенного адипокіну, що зростання рівня якого негативно впливає на стан міокарду, судинної стінки і може прискорювати оклюзію коронарних судин [121; 3]. Існують докази, за ожиріння знижується рівень протизапального протеїну теплового шоку Hsp70 жировій тканині та гепатоцитах [80], підвищується рівень прозапального протеїну Hsp60 в циркуляторному руслі [221] а інгібування шляху Hsp60 викликає нормалізацію гомеостазу адипоцитів, зменшує інсулінорезистентність і, відповідно, може протидіяти розвитку ожиріння [106]. Розвиток ВКД-індукованого дисбалансу в системі Hsp70/Hsp60 в міокарді щурів з ДІО в цілому узгоджується із вищеописаними змінами в системі протеїнів теплового шоку за ожиріння [80; 221; 106].

Таким чином, кальцитріол відіграє важливу роль в регуляції рівня H_2S в серцево-судинній системі за умов ожиріння і система H_2S/CSE дотична до реалізації кардіо- та ендотеліопротекторної дії активної форми вітаміну D_3 (рис. 6.1.). Модифікація стану системи H_2S/CSE впливає на біологічні ефекти кальцитріолу в серці та судинах, що засвідчують зміни клітинних медіаторів апоптозу, запалення, маркерів оксидативного стресу. Підвищення рівня ендогенного H_2S посилює кардіо- та ендотеліопротекторну дію кальцитріолу, яка реалізується через вплив на медіатори апоптозу та запалення ($TNF\alpha$, каспазу-3, Hsp70, Hsp60), продукування ендотеліну-1 та вісфатину, процеси вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів.

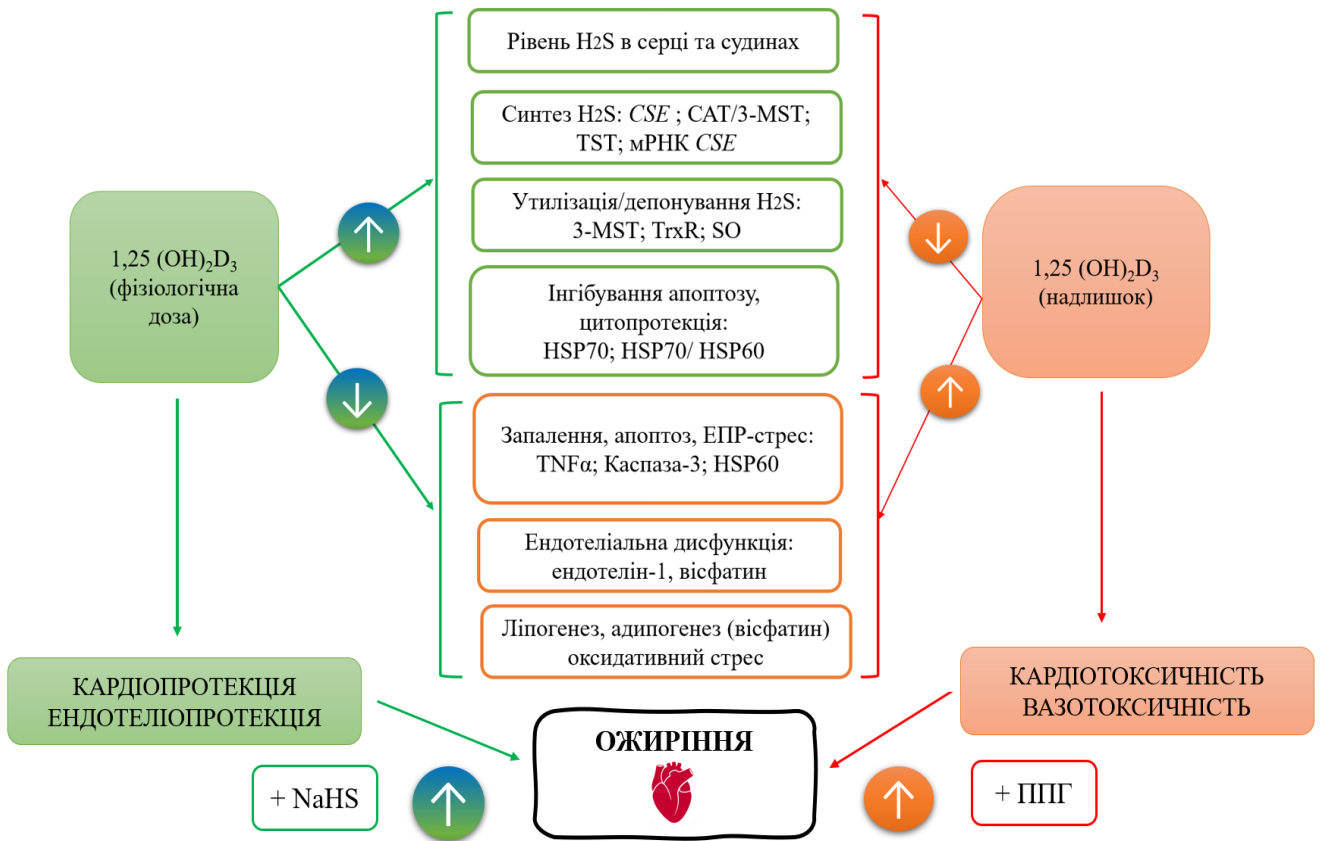


Рис. 6.1. Роль вітаміну D в регуляції обміну H₂S в серцево-судинній системі та механізмах H₂S-залежної кардіопротекції (за даними дисертаційного дослідження та наукових джерел [3; 121; 221; 148]).

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукового завдання, що полягало у встановленні ролі вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфідіду (H_2S) в серцево-судинній системі та механізмах H_2S -залежної кардіопротекції за аліментарного ожиріння в експерименті.

1. Кальцитріол ($1,25(OH)_2D_3$) різновекторно впливає на метаболізм H_2S в серці та аорті здорових статевозрілих щурів залежно від дози та тривалості застосування. Введення $1,25(OH)_2D_3$ у дозі 0,1 мкг/кг упродовж 28 діб спричиняло зростання рівня H_2S (на 52,8 та 37,1 %, $p < 0,01$), підвищення (в 1,3-1,4 рази, $p < 0,05$) активності ензимів синтезу H_2S (CSE, CAT/3-MST, TST) без суттєвих змін активності ензимів утилізації H_2S (TrxR, SO); підвищення рівня мРНК *CSE/Actb* (на 34,2 та 38,8 %, $p < 0,01$) в міокарді та аорті щурів. Введення $1,25(OH)_2D_3$ у дозі 1 мкг/кг справляло стимулюючий вплив на сульфідний метаболізм в міокарді та аорті щурів упродовж перших 14 діб, але надалі викликало зниження активності H_2S -синтезуючих ензимів із розвитком дисбалансу у шляхах CSE та CAT/3-MST (зі зниженням коефіцієнту CSE/CAT в 1,4-1,5 рази, $p < 0,05$); пригніченням експресії гена *CSE* (на 37,2 та 32,6 %, $p < 0,01$); зниженням (в 1,2-1,3 рази, $p < 0,05$) активності мітохондріальних ензимів (TST, TrxR, SO) та формуванням дефіциту H_2S .

2. Введення $1,25(OH)_2D_3$ у дозі 0,1 мкг/кг упродовж 28 діб не спричиняло змін в міокарді здорових щурів, натомість у дозі 1 мкг/кг викликало підвищення рівнів прозапальних, проапоптичних медіаторів $TNF\alpha$, каспази-3 (на 28,3; 25,3 %, $p < 0,01$), зниження рівня антиапоптичного цитопротекторного протеїну теплового шоку Hsp70 (на 17,2 %, $p < 0,05$), зменшенням коефіцієнту Hsp70 / Hsp60 (на 23,2 %, $p < 0,01$); підвищення маркерів оксидативного стресу - МДА та карбонільних груп протеїнів (на 48,2 та 50 %, $p < 0,001$). Модулятори системи H_2S /CSE достовірно модифікували міокардіальні ефекти кальцитріолу: інгібітор CSE пропаргілгліцин посилював

(у 1,5-2,2 рази, $p < 0,001$) прозапальну, проапоптичну, прооксидантну дію високої дози $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$, а донор NaHS , навпаки, зменшував ці ефекти. $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі $0,1 \text{ мкг/кг}$ зменшував кардіотоксичну дію власне пропаргілгліцину і, за поєднання з NaHS , забезпечував помірне підвищення рівня Hsp70 (на $12,5 \%$, $p < 0,05$) та зниження рівня каспази-3 (на $19,1 \%$, $p < 0,05$). Між міокардіальним рівнем H_2S та рівнем $\text{TNF}\alpha$, каспази-3 виявлялись сильні обернені кореляційні зв'язки ($r_{\text{sp}} = -0,61$; $-0,76$, $p < 0,001$) і прямий зв'язок – з рівнем Hsp70 ($r_{\text{sp}} = 0,60$, $p < 0,001$).

3. Введення $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі $0,1 \text{ мкг/кг}$ упродовж 28 діб не викликало суттєвих змін стану аорти здорових щурів, але у дозі 1 мкг/кг спричинило підвищення сироваткового рівня ендотеліну-1 (на $126,3 \%$, $p < 0,001$) та мікроскопічні ознаки пошкодження судинного ендотелію, потовщення внутрішньої еластичної мембрани, зміни гладком'язових клітин. Пропаргілгліцин потенціював вазотоксичний вплив високої дози $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$, оскільки суттєво знижував рівень H_2S в аорті (на $67,7 \%$, $p < 0,001$), стимулював зростання рівня ендотеліну-1 (на $174,6 \%$, $p < 0,001$), поглиблював морфологічні зміни судинної стінки, натомість введення NaHS сприяло ендотеліопротекції за дії високої дози $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$.

4. У щурів з дієтіндукованим ожирінням (ДІО) в міокарді та аорті реєструвалось зниження рівня H_2S (на $29,8$ та $30,1 \%$, $p < 0,001$) і активності CSE (на $27,1$ та $43,4 \%$, $p < 0,05$). Введення $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі $0,1 \text{ мкг/кг}$ викликало підвищення міокардіального та аортального рівня H_2S (на $22,3$ та $24,8 \%$, $p < 0,05$) та активності CSE (на $30,7$ та $47,8 \%$, $p < 0,05$) у тварин з ДІО. Пропаргілгліцин нівелював стимулюючий вплив $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ на активність CSE і поглиблював дефіцит H_2S в міокарді та аорті щурів з ДІО. Натомість, NaHS потенціював сприятливий вплив $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ на систему $\text{H}_2\text{S}/ \text{CSE}$ і запобігав формуванню дефіциту H_2S в міокарді та аорті щурів за умов ДІО.

5. Введення $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ у дозі $0,1 \text{ мкг/кг}$ зменшувало патобіохімічні зміни серцево-судинній системі щурів за умов ДІО: викликало зниження рівнів каспази-3, $\text{TNF}\alpha$, Hsp60 (на $26,5$; $33,7$; $17,8 \%$, $p < 0,05$), підвищення рівня

Hsp70 (на 23,9 %, $p < 0,05$), зменшувало ознаки оксидативного стресу та ендотеліальної дисфункції. Модуляція системи H_2S / CSE суттєво впливала на реалізацію серцево-судинних ефектів кальцитріолу за ДІО: пропаргілгліцин зменшував протизапальний, антиапоптичний, антиоксидантний ефекти $1,25(OH)_2D_3$, а NaHS посилював кардіопротекторну дію активної форми вітаміну D, що реалізується через зниження міокардіальних рівнів каспази-3, $TNF\alpha$, коригування дисбалансу рівнів протеїнів теплового шоку Hsp70/Hsp60, пригнічення оксидативного стресу, нормалізацію сироваткового рівня ендотеліну-1 та вісфатину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Блажченко, В. В. (2022). *Участь системи гідроген сульфїду в механїзмах розвитку ренальної дисфункції за експериментального ожиріння* [Дисертація доктора філософії, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова]. Інституційний репозитарій Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. <https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/5718?show=full>
2. Блажченко, В. В., & Заїчко, Н. В. (2022). Вплив цинк сульфату, тіосульфату натрію, ліпоєвої кислоти та таурину на обмін гідроген сульфїду в нирках щурів з дієтіндукованим ожирінням. *Медична та клінічна хімія*, 24(1), 46–52. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2022.i1.13036>
3. Бобецька, О. П. (2024). *Роль модуляторів обміну гідроген сульфїду в механїзмах ушкодження серцево-судинної системи та кардіопротекції за експериментального ожиріння* [Дисертація доктора філософії, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова]. Інституційний репозитарій Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. <https://dspace.vnmu.edu.ua/xmlui/handle/123456789/6567?show=full>
4. Бобецька, О. П., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну H₂S на рівні вісфатину, адипонектину та ліпідний спектр сироватки крові щурів за експериментального ожиріння. *Медична та клінічна хімія*, 4(98), 5-13. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i4.14362>
5. Бобецька, О. П., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профіброгенних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 4(98), 13–20. <https://doi.org/10.25040/ecpb2023.04>

6. Бобецька, О.П., Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В., Самборська, І.А. & Блажченко, В.В. (2023). *Методика моделювання кардіоміопатії за експериментального ожиріння* (Свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір №122462 від 28.12.2023). Міністерство економіки України. Національний орган інтелектуальної власності. Державна організація «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій». Опубліковано 31.01.2024, бюлетень 79, С.227. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1793446/>
7. Електронний ресурс [https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/search/1a%2C25-dihydroxyvitamin-d3?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=1a%2C25-Dihydroxyvitamin%20D3&type=product] (дата звернення 09/12/2024)
8. Заїчко, Н. В. & Бобецька, О. П. (2024). Сучасні уявлення про вісфатин як метаболічний чинник кардіоваскулярної дисфункції (огляд літератури). *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 1(28), 151-155. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2024-28\(1\)-26](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2024-28(1)-26)
9. Заїчко, Н. В., Блажченко, В. В., Бобецька, О. П., Штатько, О. І., & Остренюк, Р. С. (2020). *Спосіб корекції обміну гідрогену сульфїду за аліментарного ожиріння в експерименті* (Патент України № 143133). Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=269727>
10. Заїчко, Н.В., Блажченко, В.В., & Остренюк, Р.С. (2017). Аналіз впливу високожирової дієти на кінетичні параметри синтезу гідроген сульфїду в органах щурів. У І. М. Кліщ, & О. О. Шевчук (Відп.), *Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ): матеріали LX наук.-прак. конф., м. Тернопіль, 14 червня, 2017* (С. 288-290). ТДМУ «Укрмедкнига». <https://repository.tdmu.edu.ua/handle/1/8519>

11. Заїчко, Н.В., Бобецька, О.П., Остренюк, Р.С., & Блажченко, В.В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на продукцію медіаторів ліпогенезу в серцево-судинній системі щурів за дієт-індукованого ожиріння. *Львівські хімічні читання-2023: збірник наукових праць XIX наукової конференції, присвяченої 150-річчю Наукового товариства ім. Шевченка, м. Львів, 29-30 травня 2023* (С. 19). ЛНУ.
12. Заїчко, Н.В., Качула, С.О., & Остренюк, Р.С. (2019). Influence of calcitriol on desulfuration processes in myocardium of rats. *Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, 21(3, додаток), (С. 230)*. ТДМУ «Укрмедкнига». <http://www.biochemistry.org.ua/index.php/uk/ubs-society-newsua/5590-11-10-2019-30-04-2019>
13. Заїчко, Н., Остренюк, Р., Бобецька, О., & Блажченко, В. (2025). Вплив кальцитріолу на соматометричні параметри та рівень вісфатину в сироватці крові щурів з дієтіндукованим ожирінням за умов модуляції сульфїдного обміну. *Перспективи та інновації науки. Серія «Медицина», № 10(56), 2533-2542*. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-10\(56\)-2533-2542](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-10(56)-2533-2542)
14. Заїчко, Н. В., Пентюк, Н. О., Мельник, А. В., Штатсьько, О. І., & Андрушко, І. І. (2009). Утворення гідроген сульфїду в органах щурів. *Медична хімія, 11(4), 7–13*
15. Заїчко, Н.В., Штатсьько, О.І., & Остренюк, Р.С. (2019). Вплив кальцитріолу на стан системи гідроген сульфїду в міокарді щурів за гіпергомоцистеїнемії. У В. М. Мороз & О. О. Яковлева (Ред.), *Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції за участі міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології, м. Вінниця 7-8 листопада, 2019* (С. 159). Вінниця. Нілан-ЛТД

16. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 № 3447-IV в редакції від 10.10.2024 <https://ips.ligazakon.net/document/T063447?an=306>)
17. Кондро, М. М., Вєрвега, Б. М., & Берегова, Т. В. (2024). Дисбаланс адипокінів та показників клітинного імунітету в щурів з дієтіндукованим вісцеральним ожирінням. *Медична та клінічна хімія*, (3), 5–13. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2024.i3.14911>
18. Острєнюк, Р.С. & Заїчко, Н. В. (2022). Рівень гідроген сульфїду та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гама-ліаза. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 26 (4), 550-556. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05)
19. Острєнюк, Р.С. & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на показники апоптозу, запалення та оксидативного стресу в міокарді щурів за умов модуляції системи гідроген сульфїд / цистатіонін-гама-ліаза. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 27 (4), 570–575. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(4\)-06](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(4)-06)
20. Острєнюк, Р.С. & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів. *Медична та клінічна хімія*, (3), 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>
21. Острєнюк, Р.С. (2019). Стан системи гідроген сульфїд / цистатіонін-гама-ліаза в міокарді щурів за умов дефіциту вітаміну D₃. У В. М. Мороз, О. В. Власенко, & Н. І. Волощук (Ред.), *Перший крок в науку – 2019: матеріали XVI міжнарод. студ. наук. конф., м. Вінниця, 26-28 квітня, 2019* (С. 118-120). ВНМУ. <https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/4436>
22. Острєнюк, Р.С., & Блажченко, В.В. (2017). Вплив високожирової дієти на вміст гідроген сульфїду в міокарді та нирках щурів. У В. М. Мороз, О. В. Власенко, & Н. І. Волощук (Ред.), *Перший крок в науку – 2017: матеріали*

- XIV міжнарод. студ. наук. конф., м. Вінниця, 26-28 квітня, 2017* (С. 220-221). ВНМУ. <https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/2063>
23. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Роль системи H2S / цистатіонін-γ-ліаза в механізмах кардіопротекторної дії вітаміну D за дієт-індукованого ожиріння. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 98(4), 35–41. <https://doi.org/10.25040/ecpb2023.04.035>
24. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н.В. (2023). Вплив кальцитріолу на біохімічні зміни в аорті щурів в умовах інгібування системи гідроген сульфід / цистатіонін-гама-ліаза. У М. М. Рожко, & Л. М. Шафран (Гол.), *Бабенківські читання: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, 26-27 жовтня, 2023* (С. 65). ІФНМУ. <https://www.ifnmu.edu.ua/images/icagenda/files/Babenko.pdf>
25. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н.В. (2023). Роль гідроген сульфід у механізмах ендотеліопротекторної дії вітаміну D за експериментального ожиріння. *XII Всеукраїнська науково-практична конференція за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Клінічна фармакологія сьогодні: шляхи максимальної допомоги лікарській спеціальності»*, м. Вінниця, 9-10 листопада 2023 (С. 103). ТОВ «Твори». <https://official.doctorthinking.org/clinfarm>
26. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В., & Блажченко, В.В. (2024). Біохімічні зміни в серці щурів за дії кальцитріолу та модуляції сульфідного обміну. У О. В. Денефіль (Відпов. ред.), *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції*, м. Тернопіль, 23-25 жовтня, 2024 (С. 43). ФОП Осадца Ю.В. <https://tontpu.co.ua/public/appdocs/APP-2024.pdf>
27. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В., Бобецька, О.П., & Блажченко, В.В. (2025). *Методика підвищення кардіопротекторного ефекту вітаміну D при порушеннях сульфідного обміну за аліментарного ожиріння* (Свідectво про реєстрацію авторського права на твір № 133891 від 27.02.2025). Міністерство економіки України. Національний орган інтелектуальної

власності. Державна організація «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій». Опубліковано 31.03.2025, бюлетень 87.

<https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1849012/>

28. Acharya, P., Dalia, T., Ranka, S., Sethi, P., Oni, O. A., Safarova, M. S., Parashara, D., Gupta, K., & Barua, R. S. (2021). The Effects of Vitamin D Supplementation and 25-Hydroxyvitamin D Levels on the Risk of Myocardial Infarction and Mortality. *Journal of the Endocrine Society*, 5(10), bvab124. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab124>
29. Al-Bayyari, N., Al-Zeidaneen, S., Hailat, R., & Hamadne, J. (2018). Vitamin D₃ prevents cardiovascular diseases by lowering serum total homocysteine concentrations in overweight reproductive women: A randomized, placebo-controlled clinical trial. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 59, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.07.012>
30. Al-Bayyari, N., Hailat, R., Subih, H., Alkhalidy, H., & Eaton, A. (2021). Vitamin D₃ reduces risk of cardiovascular and liver diseases by lowering homocysteine levels: double-blinded, randomised, placebo-controlled trial. *The British journal of nutrition*, 125(2), 139–146. <https://doi.org/10.1017/S0007114520001890>
31. Al-Oanzi, Z. H., Alenazy, F. O., Alhassan, H. H., Alruwaili, Y., Alessa, A. I., Alfarm, N. B., Alanazi, M. O., & Alghofaili, S. I. (2023). The Role of Vitamin D in Reducing the Risk of Metabolic Disturbances That Cause Cardiovascular Diseases. *Journal of cardiovascular development and disease*, 10(5), 209. <https://doi.org/10.3390/jcdd10050209>
32. Alonso, N., Zelzer, S., Eibinger, G., & Herrmann, M. (2022). Vitamin D Metabolites: Analytical Challenges and Clinical Relevance. *Calcified tissue international*, 1–20. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00223-022-00961-5>

33. Alonso, N., Zelzer, S., Eibinger, G., & Herrmann, M. (2023). Vitamin D Metabolites: Analytical Challenges and Clinical Relevance. *Calcified tissue international*, *112*(2), 158–177. <https://doi.org/10.1007/s00223-022-00961-5>
34. AlQuaiz, A. M., Kazi, A., Youssef, R. M., Alshehri, N., & Alduraywish, S. A. (2020). Association between standardized vitamin 25(OH)D and dyslipidemia: a community-based study in Riyadh, Saudi Arabia. *Environmental health and preventive medicine*, *25*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0841-5>
35. Al-Zohily, B., Al-Menhali, A., Gariballa, S., Haq, A., & Shah, I. (2020). Epimers of Vitamin D: A Review. *International journal of molecular sciences*, *21*(2), 470. <https://doi.org/10.3390/ijms21020470>
36. Amer, M., & Qayyum, R. (2014). The relationship between 25-hydroxyvitamin D and homocysteine in asymptomatic adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *99*(2), 633–638. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3262>
37. Amiri, M., Zimorovat, A., & Raeisi-Dehkordi, H. (2020). Meta-analysis of vitamin D supplementation on endothelial function: Methodological limitations. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, *30*(8), 1405–1406. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.04.026>
38. Andrukhova, O., Slavic, S., Zeitz, U., Riesen, S. C., Heppelmann, M. S., Ambrisko, T. D., Markovic, M., Kuebler, W. M., & Erben, R. G. (2014). Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, *28*(1), 53–64. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1252>
39. Arfian, N., Kusuma, M. H., Anggorowati, N., Nugroho, D. B., Jeffilano, A., Suzuki, Y., Ikeda, K., & Emoto, N. (2018). Vitamin D upregulates endothelin-1, ETBR, eNOS mRNA expression and attenuates vascular remodelling and ischemia in kidney fibrosis model in mice. *Physiological research*, *67*(Suppl 1), S137–S147. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933823>
40. Barrea, L., Frias-Toral, E., Pugliese, G., Garcia-Velasquez, E., DE Los Angeles Carignano, M., Savastano, S., Colao, A., & Muscogiuri, G. (2021).

- Vitamin D in obesity and obesity-related diseases: an overview. *Minerva endocrinology*, 46(2), 177–192. <https://doi.org/10.23736/S2724-6507.20.03299-X>
41. Barrera, A., Morales-Loredo, H., Garcia, J. M., Fregoso, G., Pace, C. E., Mendiola, P. J., Naik, J. S., Gonzalez Bosc, L. V., & Kanagy, N. L. (2021). Simulated sleep apnea alters hydrogen sulfide regulation of blood flow and pressure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 320(2), H511–H519. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00672.2019>
42. Belenichev, I. F., Aliyeva, O. G., Popazova, O. O., & Bukhtiyarova, N. V. (2023). Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators. *Frontiers in cellular neuroscience*, 17, 1131683. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131683>
43. Bender, D. A. (2003). *Nutritional Biochemistry of the Vitamins (2nd ed.)*. Cambridge University Press.
44. Berridge M. J. (2017). Vitamin D deficiency and diabetes. *The Biochemical journal*, 474(8), 1321–1332. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170042>
45. Bikle D. D. (2020). The Free Hormone Hypothesis: When, Why, and How to Measure the Free Hormone Levels to Assess Vitamin D, Thyroid, Sex Hormone, and Cortisol Status. *JBMR plus*, 5(1), e10418. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10418>
46. Bikle, D. D., Malmstroem, S., & Schwartz, J. (2017). Current Controversies: Are Free Vitamin Metabolite Levels a More Accurate Assessment of Vitamin D Status than Total Levels? *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 46(4), 901–918. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.07.013>
47. Bikle, D., & Christakos, S. (2020). New aspects of vitamin D metabolism and action - addressing the skin as source and target. *Nature reviews. Endocrinology*, 16(4), 234–252. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0312-5>

48. Bikle, D. D., Patzek, S., & Wang, Y. (2018). Physiologic and pathophysiologic roles of extra renal CYP27b1: Case report and review. *Bone reports*, 8, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.02.004>
49. Blazhchenko, V.V., Ostrenyuk, R.S., & Zaichko, N.V. (2017). The activity of enzymes of transsulfuration in kidneys and myocardium of rats with experimental obesity. In A. Bogucka-Kocka (Ed.), *VIII Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, 18-20 September 2017, Lublin, Poland: Programme and Book of Abstract (p. 52)*. Polihymnia
50. Blumberg, J. M., Tzamelis, I., Astapova, I., Lam, F. S., Flier, J. S., & Hollenberg, A. N. (2006). Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(16), 11205–11213. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510343200>
51. Bobetska O. P., & Zaichko N. V. (2023). The effect of lipoic acid, zinc sulfate and sodium thiosulfate on H₂S metabolism in cardiovascular system of rats in experimental obesity. *Bulletin of problems in biology and medicine*, 4(171), 134–145. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-4-171-134-145>
52. Bonnet, L., Karkeni, E., Couturier, C., Astier, J., Defoort, C., Svilar, L., Tourniaire, F., Mounien, L., & Landrier, J. F. (2021). Four days high fat diet modulates vitamin D metabolite levels and enzymes in mice. *The Journal of endocrinology*, 248(1), 87–93. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0198>
53. Borges, C. C., Salles, A. F., Bringhenti, I., Mandarim-DE-Lacerda, C. A., & Aguilá, M. B. (2018). Vitamin D Deficiency Increases Lipogenesis and Reduces Beta-Oxidation in the Liver of Diet-Induced Obese Mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 64(2), 106–115. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.106>
54. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

55. Cantorna, M. T., Snyder, L., & Arora, J. (2019). Vitamin A and vitamin D regulate the microbial complexity, barrier function, and the mucosal immune responses to ensure intestinal homeostasis. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 54(2), 184–192. <https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1611734>
56. Caprio, M., Infante, M., Calanchini, M., Mammi, C., & Fabbri, A. (2017). Vitamin D: not just the bone. Evidence for beneficial pleiotropic extraskeletal effects. *Eating and weight disorders : EWD*, 22(1), 27–41. <https://doi.org/10.1007/s40519-016-0312-6>
57. Carlberg C. (2022). Vitamin D in the Context of Evolution. *Nutrients*, 14(15), 3018. <https://doi.org/10.3390/nu14153018>
58. Carlberg, C., & Velleuer, E. (2024). Vitamin D and Aging: Central Role of Immunocompetence. *Nutrients*, 16(3), 398. <https://doi.org/10.3390/nu16030398>
59. Chaiprasongsuk, A., Janjetovic, Z., Kim, T. K., Schwartz, C. J., Tuckey, R. C., Tang, E. K. Y., Raman, C., Panich, U., & Slominski, A. T. (2020). Hydroxylumisterols, Photoproducts of Pre-Vitamin D₃, Protect Human Keratinocytes against UVB-Induced Damage. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9374. <https://doi.org/10.3390/ijms21249374>
60. Chandra, D., Choy, G., & Tang, D. G. (2007). Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *The Journal of biological chemistry*, 282(43), 31289–31301. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702777200>
61. Chang E. (2024). Vitamin D Mitigates Hepatic Fat Accumulation and Inflammation and Increases SIRT1/AMPK Expression in AML-12 Hepatocytes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(6), 1401. <https://doi.org/10.3390/molecules29061401>

62. Charoenngam, N., & Holick, M. F. (2020). Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients*, *12*(7), 2097. <https://doi.org/10.3390/nu12072097>
63. Chen, S., Villalta, S. A., & Agrawal, D. K. (2016). FOXO1 Mediates Vitamin D Deficiency-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *31*(3), 585–595. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2729>
64. Chen, S., Glenn, D. J., Ni, W., Grigsby, C. L., Olsen, K., Nishimoto, M., Law, C. S., & Gardner, D. G. (2008). Expression of the vitamin d receptor is increased in the hypertrophic heart. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *52*(6), 1106–1112. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119602>
65. Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., & Carmeliet, G. (2016). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews*, *96*(1), 365–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
66. Chung, C., Silwal, P., Kim, I., Modlin, R. L., & Jo, E. K. (2020). Vitamin D-Cathelicidin Axis: at the Crossroads between Protective Immunity and Pathological Inflammation during Infection. *Immune network*, *20*(2), e12. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e12>
67. Cohen, H. J., & Fridovich, I. (1971). Hepatic sulfite oxidase. Purification and properties. *The Journal of biological chemistry*, *246*(2), 359–366. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)62499-8/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)62499-8/pdf)
68. Comas, F., Latorre, J., Ortega, F., Arnoriaga Rodríguez, M., Kern, M., Lluch, A., Ricart, W., Blüher, M., Gotor, C., Romero, L. C., Fernández-Real, J. M., & Moreno-Navarrete, J. M. (2021). Activation of Endogenous H₂S Biosynthesis or Supplementation with Exogenous H₂S Enhances Adipose Tissue Adipogenesis and Preserves Adipocyte Physiology in Humans. *Antioxidants & redox signaling*, *35*(5), 319–340. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8206>

69. Connelly, P. W., Maguire, G. F., & Draganov, D. I. (2004). Separation and quantitative recovery of mouse serum arylesterase and carboxylesterase activity. *Journal of lipid research*, *45*(3), 561–566. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300464-JLR200>
70. Contreras-Bolívar, V., García-Fontana, B., García-Fontana, C., & Muñoz-Torres, M. (2021). Mechanisms Involved in the Relationship between Vitamin D and Insulin Resistance: Impact on Clinical Practice. *Nutrients*, *13*(10), 3491. <https://doi.org/10.3390/nu13103491>
71. Contreras-Bolívar, V., García-Fontana, B., García-Fontana, C., & Muñoz-Torres, M. (2023). Vitamin D and COVID-19: where are we now?. *Postgraduate medicine*, *135*(3), 195–207. <https://doi.org/10.1080/00325481.2021.2017647>
72. Cortese, F., Costantino, M. F., Luzi, G., Di Marino, S., Giordano, P., & Monitillo, F. (2022). Vitamin D and cardiovascular disease risk. A literature overview. *Molecular biology reports*, *49*(9), 8925–8942. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07373-6>
73. Cosentino, N., Campodonico, J., Milazzo, V., De Metrio, M., Brambilla, M., Camera, M., & Marenzi, G. (2021). Vitamin D and Cardiovascular Disease: Current Evidence and Future Perspectives. *Nutrients*, *13*(10), 3603. <https://doi.org/10.3390/nu13103603>
74. Cristelo, C., Machado, A., Sarmiento, B., & Gama, F. M. (2021). The roles of vitamin D and cathelicidin in type 1 diabetes susceptibility. *Endocrine connections*, *10*(1), R1–R12. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0484>
75. Crowther J. R. The ELISA Guidebook / J.R. Crowther. – Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2001. – P. 436.
76. Cui, C., Fan, J., Zeng, Q., Cai, J., Chen, Y., Chen, Z., Wang, W., Li, S. Y., Cui, Q., Yang, J., Tang, C., Xu, G., Cai, J., & Geng, B. (2020). CD4⁺ T-Cell Endogenous Cystathionine γ Lyase-Hydrogen Sulfide Attenuates Hypertension by Sulfhydrating Liver Kinase B1 to Promote T Regulatory Cell

- Differentiation and Proliferation. *Circulation*, 142(18), 1752–1769.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.045344>
77. Dattilo M. (2020). The role of host defences in Covid 19 and treatments thereof. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 26(1), 90.
<https://doi.org/10.1186/s10020-020-00216-9>
78. Dehghani, A., Hafizibarjin, Z., Najjari, R., Kaseb, F., & Safari, F. (2019). Resveratrol and 1,25-dihydroxyvitamin D co-administration protects the heart against D-galactose-induced aging in rats: evaluation of serum and cardiac levels of klotho. *Aging clinical and experimental research*, 31(9), 1195–1205.
<https://doi.org/10.1007/s40520-018-1075-x>
79. Della Nera, G., Sabatino, L., Gaggini, M., Gorini, F., & Vassalle, C. (2023). Vitamin D Determinants, Status, and Antioxidant/Anti-inflammatory-Related Effects in Cardiovascular Risk and Disease: Not the Last Word in the Controversy. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(4), 948.
<https://doi.org/10.3390/antiox12040948>
80. Di Naso, F. C., Porto, R. R., Fillmann, H. S., Maggioni, L., Padoin, A. V., Ramos, R. J., Mottin, C. C., Bittencourt, A., Marroni, N. A., & de Bittencourt, P. I., Jr (2015). Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 23(1), 120–129. <https://doi.org/10.1002/oby.20919>
81. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Website: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/2019-06-26>
82. Dominguez, L. J., Farruggia, M., Veronese, N., & Barbagallo, M. (2021). Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment. *Metabolites*, 11(4), 255.
<https://doi.org/10.3390/metabo11040255>
83. Du, B., Fu, Q., Yang, Q., Yang, Y., Li, R., Yang, X., Yang, Q., Li, S., Tian, J., & Liu, H. (2025). Different types of cell death and their interactions in

- myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cell death discovery*, 11(1), 87. <https://doi.org/10.1038/s41420-025-02372-5>
84. Ellam, T., Hameed, A., ul Haque, R., Muthana, M., Wilkie, M., Francis, S. E., & Chico, T. J. (2014). Vitamin D deficiency and exogenous vitamin D excess similarly increase diffuse atherosclerotic calcification in apolipoprotein E knockout mice. *PloS one*, 9(2), e88767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088767>
85. Elkhwanky, M. S., Kummu, O., Piltonen, T. T., Laru, J., Morin-Papunen, L., Mutikainen, M., Tavi, P., & Hakkola, J. (2020). Obesity Represses CYP2R1, the Vitamin D 25-Hydroxylase, in the Liver and Extrahepatic Tissues. *JBMR plus*, 4(11), e10397. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10397>
86. European Parliament. (2010). *Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes*. Official Journal of the European Union, L 276, 33–79. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj/eng>
87. Fakhoury, H., Kvietys, P. R., AlKattan, W., Anouti, F. A., Elahi, M. A., Karras, S. N., & Grant, W. B. (2020). Vitamin D and intestinal homeostasis: Barrier, microbiota, and immune modulation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 200, 105663. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105663>
88. Fang, Y., Song, F., Gao, C., & Wang, Z. (2025). Hydrocortisone improves post-resuscitation myocardial dysfunction by inhibiting the NF-κB pathway. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 103, 1–11. <https://doi.org/10.1139/bcb-2024-0162>
89. Feng, X., Zhang, H., Shi, M., Chen, Y., Yang, T., & Fan, H. (2020). Toxic effects of hydrogen sulfide donor NaHS induced liver apoptosis is regulated by complex IV subunits and reactive oxygen species generation in rats. *Environmental toxicology*, 35(3), 322–332. <https://doi.org/10.1002/tox.22868>

90. Flori, L., Benedetti, G., Calderone, V., & Testai, L. (2024). Hydrogen Sulfide and Irisin, Potential Allies in Ensuring Cardiovascular Health. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *13*(5), 543. <https://doi.org/10.3390/antiox13050543>
91. Fornes, O., Castro-Mondragon, J. A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P. A., Modi, B. P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranašić, D., Santana-Garcia, W., Tan, G., Chèneby, J., Ballester, B., Parcy, F., Sandelin, A., Lenhard, B., Wasserman, W. W., & Mathelier, A. (2020). JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research*, *48*(D1), D87–D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>
92. Gallardo Martin, E., & Cousillas Castiñeiras, A. (2021). Vitamin D modulation and microRNAs in gastric cancer: prognostic and therapeutic role. *Translational cancer research*, *10*(6), 3111–3127. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-2813>
93. Gasparini, P. V. F., Matias, A. M., Torezani-Sales, S., Kobi, J. B. B. S., Siqueira, J. S., Corrêa, C. R., Lima-Leopoldo, A. P., & Leopoldo, A. S. (2021). High-Fat and Combined High-Fat and Sucrose Diets Promote Cardiac Oxidative Stress Independent of Nox2 Redox Regulation and Obesity in Rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *55*(5), 618–634. <https://doi.org/10.33594/000000441>
94. Ghatage, T., Singh, S., Mandal, K., & Dhar, A. (2024). Co-activation of Mas and pGCA receptors suppresses Endothelin-1-induced endothelial dysfunction via nitric oxide/cGMP system. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, *1870*(4), 167110. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167110>
95. Giacolone, J., Osofsky, R., Matheson, B., Perales, G., Shekarriz, R., Kanagy, N., & Clark, R. M. (2024). H₂S-Eluting Hydrogels Promote In Vitro Angiogenesis and Augment In Vivo Ischemic Wound Revascularization. *Biomolecules*, *14*(11), 1350. <https://doi.org/10.3390/biom14111350>

96. Giovannucci E. Chapter 58—Methods of Evaluating Population Studies of Vitamin D: Strengths and Weaknesses. In: Feldman D., editor. *Vitamin D*. 4th ed. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2018. pp. 3–14.
97. Giustina, A., Bilezikian, J. P., Adler, R. A., Banfi, G., Bikle, D. D., Binkley, N. C., Bollerslev, J., Bouillon, R., Brandi, M. L., Casanueva, F. F., di Filippo, L., Donini, L. M., Ebeling, P. R., Fuleihan, G. E., Fassio, A., Frara, S., Jones, G., Marcocci, C., Martineau, A. R., Minisola, S., ... Virtanen, J. K. (2024). Consensus Statement on Vitamin D Status Assessment and Supplementation: Whys, Whens, and Hows. *Endocrine reviews*, *45*(5), 625–654. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnae009>
98. Gomez, C. B., de la Cruz, S. H., Medina-Terol, G. J., Beltran-Ornelas, J. H., Sánchez-López, A., Silva-Velasco, D. L., & Centurión, D. (2019). Chronic administration of NaHS and L-Cysteine restores cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats. *European journal of pharmacology*, *863*, 172707. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172707>
99. Gorobeiko, M., Zdorna, V., & Dinets, A. (2022). Positive effect of vitamin D supplementation on weight loss in obese patients treated with glucagon-like peptide 1 and lifestyle interventions. *International journal of endocrinology (Ukraine)*, *18*(5), 278–284. <https://doi.org/10.22141/2224-0721.18.5.2022.1186>
100. Gu, J. C., Wu, Y. G., Huang, W. G., Fan, X. J., Chen, X. H., Zhou, B., Lin, Z. J., & Feng, X. L. (2022). Effect of vitamin D on oxidative stress and serum inflammatory factors in the patients with type 2 diabetes. *Journal of clinical laboratory analysis*, *36*(5), e24430. <https://doi.org/10.1002/jcla.24430>
101. Hafez, A. A., Samiei, S., Salimi, A., Jamali, Z., Khezri, S., & Sheikhghaderi, H. (2021). Calcitriol attenuates the cytotoxicity induced by aluminium phosphide via inhibiting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rat isolated cardiomyocytes. *Pesticide biochemistry and physiology*, *176*, 104883. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104883>

102. Hamilton, J. P., Potter, J. J., Koganti, L., Meltzer, S. J., & Mezey, E. (2014). Effects of vitamin D₃ stimulation of thioredoxin-interacting protein in hepatocellular carcinoma. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, *44*(13), 1357–1366. <https://doi.org/10.1111/hepr.12302>
103. Hanel, A., Bendik, I., & Carlberg, C. (2021). Transcriptome-Wide Profile of 25-Hydroxyvitamin D₃ in Primary Immune Cells from Human Peripheral Blood. *Nutrients*, *13*(11), 4100. <https://doi.org/10.3390/nu13114100>
104. Hanel, A., Veldhuizen, C., & Carlberg, C. (2022). Gene-Regulatory Potential of 25-Hydroxyvitamin D₃ and D₂. *Frontiers in nutrition*, *9*, 910601. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.910601>
105. Hanna, D., Kumar, R., & Banerjee, R. (2023). A Metabolic Paradigm for Hydrogen Sulfide Signaling via Electron Transport Chain Plasticity. *Antioxidants & redox signaling*, *38*(1-3), 57–67. <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0067>
106. Hauffe, R., Rath, M., Schell, M., Ritter, K., Kappert, K., Deubel, S., Ott, C., Jähnert, M., Jonas, W., Schürmann, A., & Kleinridders, A. (2021). HSP60 reduction protects against diet-induced obesity by modulating energy metabolism in adipose tissue. *Molecular metabolism*, *53*, 101276. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101276>
107. Herrmann, M., Farrell, C. L., Pusceddu, I., Fabregat-Cabello, N., & Cavalier, E. (2017). Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, *55*(1), 3–26. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0264>
108. Holick M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*, *357*(3), 266–281. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>
109. Hu, H. J., Jiang, Z. S., Zhou, S. H., & Liu, Q. M. (2016). Hydrogen sulfide suppresses angiotensin II-stimulated endothelin-1 generation and subsequent cytotoxicity-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial

- cells via NF- κ B. *Molecular medicine reports*, 14(5), 4729–4740.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5827>
110. Huang, P., Shen, Z., Yu, W., Huang, Y., Tang, C., Du, J., & Jin, H. (2017). Hydrogen Sulfide Inhibits High-Salt Diet-Induced Myocardial Oxidative Stress and Myocardial Hypertrophy in Dahl Rats. *Frontiers in pharmacology*, 8, 128. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00128>
111. Huang, Y., Wang, G., Zhou, Z., Tang, Z., Zhang, N., Zhu, X., & Ni, X. (2021). Endogenous Hydrogen Sulfide Is an Important Factor in Maintaining Arterial Oxygen Saturation. *Frontiers in pharmacology*, 12, 677110. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.677110>
112. Hyppönen, E., & Boucher, B. J. (2018). Adiposity, vitamin D requirements, and clinical implications for obesity-related metabolic abnormalities. *Nutrition reviews*, 76(9), 678–692. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy034>
113. Islam, K. N., Nguyen, I. D., Islam, R., Pirzadah, H., & Malik, H. (2024). Roles of Hydrogen Sulfide (H₂S) as a Potential Therapeutic Agent in Cardiovascular Diseases: A Narrative Review. *Cureus*, 16(7), e64913. <https://doi.org/10.7759/cureus.64913>
114. Jain, S. K., Huning, L., & Micinski, D. (2014). Hydrogen sulfide upregulates glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, glutamate-cysteine ligase modifier subunit, and glutathione and inhibits interleukin-1 β secretion in monocytes exposed to high glucose levels. *Metabolic syndrome and related disorders*, 12(5), 299–302. <https://doi.org/10.1089/met.2014.0022>
115. Jain, S. K., & Micinski, D. (2013). Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 437(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.004>
116. Jain, S. K., Justin Margret, J., Abrams, S. A., Levine, S. N., & Bhusal, K. (2024). The Impact of Vitamin D and L-Cysteine Co-Supplementation on

- Upregulating Glutathione and Vitamin D-Metabolizing Genes and in the Treatment of Circulating 25-Hydroxy Vitamin D Deficiency. *Nutrients*, 16(13), 2004. <https://doi.org/10.3390/nu16132004>
117. Jain, S. K., Manna, P., Micinski, D., Lieblong, B. J., Kahlon, G., Morehead, L., Hoeldtke, R., Bass, P. F., 3rd, & Levine, S. N. (2013). In African American type 2 diabetic patients, is vitamin D deficiency associated with lower blood levels of hydrogen sulfide and cyclic adenosine monophosphate, and elevated oxidative stress?. *Antioxidants & redox signaling*, 18(10), 1154–1158. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4843>
118. Jamali, N., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2018). Vitamin D and regulation of vascular cell function. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 314(4), H753–H765. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00319.2017>
119. Jeddi, S., Gheibi, S., Kashfi, K., Carlström, M., & Ghasemi, A. (2020). Protective effect of intermediate doses of hydrogen sulfide against myocardial ischemia-reperfusion injury in obese type 2 diabetic rats. *Life sciences*, 256, 117855. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117855>
120. Ji, Y., Huang, W., Chen, Y., Zhang, X., Wu, F., Tang, W., Lu, Z., & Huang, C. (2023). Inhibition of MMP-2 and MMP-9 attenuates surgery-induced cognitive impairment in aged mice. *Brain research bulletin*, 204, 110810. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.110810>
121. Ji, X., Jin, S., Wang, Y., Chen, Y., & Zhang, J. (2022). Visfatin and 25-Hydroxyvitamin D3 Levels Affect Coronary Collateral Circulation Development in Patients with Chronic Coronary Total Occlusion. *Cardiovascular Innovations and Applications*, 6(3), 161–169. <https://doi.org/10.15212/CVIA.2021.0032>
122. Jia, G., Li, H., Gan, H., Wang, J., Zhu, Z., Wang, Y., Ye, Y., Shang, X., & Niu, W. (2024). Persulfidation of Human Cystathionine γ -Lyase Inhibits Its Activity: A Negative Feedback Regulation Mechanism for H₂S

- Production. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 13(11), 1402.
<https://doi.org/10.3390/antiox13111402>
123. Jiang, X., Peng, M., Chen, S., Wu, S., & Zhang, W. (2019). Vitamin D deficiency is associated with dyslipidemia: a cross-sectional study in 3788 subjects. *Current medical research and opinion*, 35(6), 1059–1063.
<https://doi.org/10.1080/03007995.2018.1552849>
124. Jung, H. I., Lim, H. W., Kim, B. C., Park, E. H., & Lim, C. J. (2004). Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Yonsei medical journal*, 45(2), 263–272.
<https://doi.org/10.3349/ymj.2004.45.2.263>
125. Kang, E. J., Lee, J. E., An, S. M., Lee, J. H., Kwon, H. S., Kim, B. C., Kim, S. J., Kim, J. M., Hwang, D. Y., Jung, Y. J., Yang, S. Y., Kim, S. C., & An, B. S. (2015). The effects of vitamin D3 on lipogenesis in the liver and adipose tissue of pregnant rats. *International journal of molecular medicine*, 36(4), 1151–1158. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2300>
126. Kang, S. C., Sohn, E. H., & Lee, S. R. (2020). Hydrogen Sulfide as a Potential Alternative for the Treatment of Myocardial Fibrosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 4105382.
<https://doi.org/10.1155/2020/4105382>
127. Kanemaru, E., & Ichinose, F. (2025). Essential role of sulfide oxidation in brain health and neurological disorders. *Pharmacology & therapeutics*, 266, 108787. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2024.108787>
128. Karpovets T.P., Shabanova N.V., Konopelnyuk V.V., Savchuk O.M., & Ostapchenko L.I. (2014). High-calorie diet as a factor of obesity development in rats. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological System)*, 6(2), 139-142.
http://ibhb.chnu.edu.ua/uploads/files/vb/BS_T6_V2_2014.pdf
129. Katsouda, A., Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2018). Reduced adipose tissue H2S in obesity. *Pharmacological research*, 128, 190–199.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.09.023>

130. Kheiri, B., Abdalla, A., Osman, M., Ahmed, S., Hassan, M., & Bachuwa, G. (2018). Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular diseases: a narrative review. *Clinical hypertension*, 24, 9. <https://doi.org/10.1186/s40885-018-0094-4>
131. Khosravi, Z. S., Kafeshani, M., Tavasoli, P., Zadeh, A. H., & Entezari, M. H. (2018). Effect of Vitamin D Supplementation on Weight Loss, Glycemic Indices, and Lipid Profile in Obese and Overweight Women: A Clinical Trial Study. *International journal of preventive medicine*, 9, 63. https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_329_15
132. Kim, D. -H., Meza, C. A., Clarke, H., Kim, J. -S., & Hickner, R. C. (2020). Vitamin D and Endothelial Function. *Nutrients*, 12(2), 575. <https://doi.org/10.3390/nu12020575>
133. Kim, Y., Kim, Y. S., Kim, M., Kim, J. M., Lee, H. H., & Kim, T. H. (2019). Thioredoxin-interacting Protein (TXNIP) Mediates Thioredoxin-dependent Antioxidant Mechanism in Endometrial Cancer Cells Treated With 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Anticancer research*, 39(9), 4795–4803. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13664>
134. Kjalarsdottir, L., Tersey, S. A., Vishwanath, M., Chuang, J. C., Posner, B. A., Mirmira, R. G., & Repa, J. J. (2019). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances glucose-stimulated insulin secretion in mouse and human islets: a role for transcriptional regulation of voltage-gated calcium channels by the vitamin D receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 185, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.07.004>
135. Kolluru, G. K., Shackelford, R. E., Shen, X., Dominic, P., & Kevil, C. G. (2023). Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease. *Nature reviews. Cardiology*, 20(2), 109–125. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6>
136. Kolluru, G. K., Shen, X., & Kevil, C. G. (2020). Reactive Sulfur Species: A New Redox Player in Cardiovascular

- Pathophysiology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 40(4), 874–884. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314084>
137. Kosacka, M., & Brzecka, A. (2021). Endothelin-1 and LOX-1 as Markers of Endothelial Dysfunction in Obstructive Sleep Apnea Patients. *International journal of environmental research and public health*, 18(3), 1319. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031319>
138. Kostrycki, I. M., Wildner, G., Donato, Y. H., Dos Santos, A. B., Beber, L. C. C., Frizzo, M. N., Ludwig, M. S., Keane, K. N., Cruzat, V., Rhoden, C. R., & Heck, T. G. (2019). Effects of High-Fat Diet on eHSP72 and Extra-to-Intracellular HSP70 Levels in Mice Submitted to Exercise under Exposure to Fine Particulate Matter. *Journal of diabetes research*, 2019, 4858740. <https://doi.org/10.1155/2019/4858740>
139. Kriebitzsch, C., Verlinden, L., Eelen, G., van Schoor, N. M., Swart, K., Lips, P., Meyer, M. B., Pike, J. W., Boonen, S., Carlberg, C., Vitvitsky, V., Bouillon, R., Banerjee, R., & Verstuyf, A. (2011). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ influences cellular homocysteine levels in murine preosteoblastic MC3T3-E1 cells by direct regulation of cystathionine β-synthase. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(12), 2991–3000. <https://doi.org/10.1002/jbmr.493>
140. Krishnan-Sivadoss, I., Mijares-Rojas, I. A., Villarreal-Leal, R. A., Torre-Amione, G., Knowlton, A. A., & Guerrero-Beltrán, C. E. (2021). Heat shock protein 60 and cardiovascular diseases: An intricate love-hate story. *Medicinal research reviews*, 41(1), 29–71. <https://doi.org/10.1002/med.21723>
141. Krown, K. A., Page, M. T., Nguyen, C., Zechner, D., Gutierrez, V., Comstock, K. L., Glembotski, C. C., Quintana, P. J., & Sabbadini, R. A. (1996). Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *The Journal of clinical investigation*, 98(12), 2854–2865. <https://doi.org/10.1172/JCI119114>

142. Latic, N., & Erben, R. G. (2020). Vitamin D and Cardiovascular Disease, with Emphasis on Hypertension, Atherosclerosis, and Heart Failure. *International journal of molecular sciences*, *21*(18), 6483. <https://doi.org/10.3390/ijms21186483>
143. Lee, H., Bae, S., & Yoon, Y. (2012). Anti-adipogenic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ are mediated by the maintenance of the wingless-type MMTV integration site/ β -catenin pathway. *International journal of molecular medicine*, *30*(5), 1219–1224. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1101>
144. Lee, D., Kim, S., Koo, Y., Chae, Y., Wang, J., Kim, S., Yun, T., Yang, M. P., Kang, B. T., & Kim, H. (2023). Expression of vitamin D receptor, CYP24A1, and CYP27B1 in normal and inflamed canine pancreases. *Frontiers in veterinary science*, *10*, 1265203. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1265203>
145. Leopoldo, A. S., Lima-Leopoldo, A. P., Nascimento, A. F., Luvizotto, R. A., Sugizaki, M. M., Campos, D. H., da Silva, D. C., Padovani, C. R., & Cicogna, A. C. (2016). Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, *49*(4), e5028. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20155028>
146. Leucker, T. M., Nomura, Y., Kim, J. H., Bhatta, A., Wang, V., Wecker, A., Jandu, S., Santhanam, L., Berkowitz, D., Romer, L., & Pandey, D. (2017). Cystathionine γ -lyase protects vascular endothelium: a role for inhibition of histone deacetylase 6. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *312*(4), H711–H720. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00724.2016>
147. Li, Y. C., Kong, J., Wei, M., Chen, Z. F., Liu, S. Q., & Cao, L. P. (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *The Journal of clinical investigation*, *110*(2), 229–238. <https://doi.org/10.1172/JCI15219>

148. Li, H., Ren, J., Li, Y., Wu, Q., & Wei, J. (2023). Oxidative stress: The nexus of obesity and cognitive dysfunction in diabetes. *Frontiers in endocrinology*, *14*, 1134025. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1134025>
149. Li, H., Teng, X., Yang, R., Guo, Q., Xue, H., Xiao, L., Duan, X., Tian, D., Feng, X., & Wu, Y. (2017). Hydrogen Sulfide Facilitates the Impaired Sensitivity of Carotid Sinus Baroreflex in Rats with Vascular Calcification. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 629. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00629>
150. Li, Z., Xia, H., Sharp, T. E., 3rd, LaPenna, K. B., Katsouda, A., Elrod, J. W., Pfeilschifter, J., Beck, K. F., Xu, S., Xian, M., Goodchild, T. T., Papapetropoulos, A., & Lefer, D. J. (2023). Hydrogen Sulfide Modulates Endothelial-Mesenchymal Transition in Heart Failure. *Circulation research*, *132*(2), 154–166. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.321326>
151. Liao, Y., Fan, Y., He, Q., Li, Y., Wu, D., & Jiang, E. (2022). Exogenous H₂S Ameliorates High Salt-Induced Hypertension by Alleviating Oxidative Stress and Inflammation in the Paraventricular Nucleus in Dahl S Rats. *Cardiovascular toxicology*, *22*(5), 477–491. <https://doi.org/10.1007/s12012-022-09729-7>
152. Libiad, M., Motl, N., Akey, D. L., Sakamoto, N., Fearon, E. R., Smith, J. L., & Banerjee, R. (2018). Thiosulfate sulfurtransferase-like domain-containing 1 protein interacts with thioredoxin. *The Journal of biological chemistry*, *293*(8), 2675–2686. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000826>
153. Lima, A., Ferin, R., Bourbon, M., Baptista, J., & Pavão, M. L. (2019). Hypercysteinemia, A Potential Risk Factor for Central Obesity and Related Disorders in Azores, Portugal. *Journal of nutrition and metabolism*, *2019*, 1826780. <https://doi.org/10.1155/2019/1826780>
154. Liu, L., Gong, W., Zhang, S., Shen, J., Wang, Y., Chen, Y., & Meng, G. (2021). Hydrogen Sulfide Attenuates Angiotensin II-Induced Cardiac Fibroblast Proliferation and Transverse Aortic Constriction-Induced

- Myocardial Fibrosis through Oxidative Stress Inhibition via Sirtuin 3. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 9925771. <https://doi.org/10.1155/2021/9925771>
155. Liu, X. Y., Qian, L. L., & Wang, R. X. (2022). Hydrogen Sulfide-Induced Vasodilation: The Involvement of Vascular Potassium Channels. *Frontiers in pharmacology*, 13, 911704. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.911704>
156. Łoboda, A., & Dulak, J. (2024). Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide and Its Potential Therapeutic Implications in the Amelioration of Duchenne Muscular Dystrophy Cardiomyopathy. *Cells*, 13(2), 158. <https://doi.org/10.3390/cells13020158>
157. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf)
158. Luo, Y., Melhem, S., Feelisch, M., Chatre, L., Morton, N. M., Dolga, A. M., & van Goor, H. (2025). Thiosulphate sulfurtransferase: Biological roles and therapeutic potential. *Redox biology*, 82, 103595. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2025.103595>
159. Lutz, W., Kohno, K., & Kumar, R. (2001). The role of heat shock protein 70 in vitamin D receptor function. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(5), 1211–1219. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4711>
160. Lv, B., Chen, S., Tang, C., Jin, H., Du, J., & Huang, Y. (2020). Hydrogen sulfide and vascular regulation - An update. *Journal of advanced research*, 27, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.05.007>
161. Ma, R., Deng, X. L., Du, G. L., Li, C., Xiao, S., Aibibai, Y., & Zhu, J. (2016). Active vitamin D₃, 1,25-(OH)₂D₃, protects against macrovasculopathy in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Genetics and*

- molecular research* : *GMR*, 15(2), 10.4238/gmr.15028113.
<https://doi.org/10.4238/gmr.15028113>
162. Macabrey, D., Longchamp, A., Déglise, S., & Allagnat, F. (2022). Clinical Use of Hydrogen Sulfide to Protect Against Intimal Hyperplasia. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 9, 876639. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.876639>
163. Manna, P., & Jain, S. K. (2012). Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine- γ -lyase (CSE) activation and H₂S formation in 3T3L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 287(50), 42324–42332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407833>
164. Manousaki, D., Mokry, L. E., Ross, S., Goltzman, D., & Richards, J. B. (2016). Mendelian Randomization Studies Do Not Support a Role for Vitamin D in Coronary Artery Disease. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 9(4), 349–356. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001396>
165. Mao, X., Xing, X., Xu, R., Gong, Q., He, Y., Li, S., Wang, H., Liu, C., Ding, X., Na, R., Liu, Z., & Qu, Y. (2016). Folic Acid and Vitamins D and B12 Correlate With Homocysteine in Chinese Patients With Type-2 Diabetes Mellitus, Hypertension, or Cardiovascular Disease. *Medicine*, 95(6), e2652. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002652>
166. Martens, P. J., Gysemans, C., Verstuyf, A., & Mathieu, A. C. (2020). Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients*, 12(5), 1248. <https://doi.org/10.3390/nu12051248>
167. Martín Giménez, V. M., Menéndez, S. G., Holick, M. F., & Manucha, W. (2023). Vitamin D: A Repurposed Anti-inflammatory Drug at the Cardiovascular Level. *Current protein & peptide science*, 24(7), 533–535. <https://doi.org/10.2174/1389203724666230622162539>
168. Martínez-Miguel, P., Valdivielso, J. M., Medrano-Andrés, D., Román-García, P., Cano-Peñalver, J. L., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., & López-Ongil, S. (2014). The active form of vitamin D, calcitriol, induces a

- complex dual upregulation of endothelin and nitric oxide in cultured endothelial cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 307(12), E1085–E1096.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00156.2014>
169. Marutani, E., & Ichinose, F. (2020). Emerging pharmacological tools to control hydrogen sulfide signaling in critical illness. *Intensive care medicine experimental*, 8(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-0296-4>
170. Marcinowska-Suchowierska, E., Kupisz-Urbańska, M., Łukaszewicz, J., Płudowski, P., & Jones, G. (2018). Vitamin D Toxicity-A Clinical Perspective. *Frontiers in endocrinology*, 9, 550. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00550>
171. Masenga, S. K., Kabwe, L. S., Chakulya, M., & Kirabo, A. (2023). Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 7898. <https://doi.org/10.3390/ijms24097898>
172. Melideo, S. L., Jackson, M. R., & Jorns, M. S. (2014). Biosynthesis of a central intermediate in hydrogen sulfide metabolism by a novel human sulfurtransferase and its yeast ortholog. *Biochemistry*, 53(28), 4739–4753. <https://doi.org/10.1021/bi500650h>
173. Meng, G., Xiao, Y., Ma, Y., Tang, X., Xie, L., Liu, J., Gu, Y., Yu, Y., Park, C. M., Xian, M., Wang, X., Ferro, A., Wang, R., Moore, P. K., Zhang, Z., Wang, H., Han, Y., & Ji, Y. (2016). Hydrogen Sulfide Regulates Krüppel-Like Factor 5 Transcription Activity via Specificity Protein 1 S-Sulfhydration at Cys664 to Prevent Myocardial Hypertrophy. *Journal of the American Heart Association*, 5(9), e004160. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004160>
174. Meyer, M. B., & Pike, J. W. (2020). Mechanistic homeostasis of vitamin D metabolism in the kidney through reciprocal modulation of Cyp27b1 and Cyp24a1 expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 196, 105500. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105500>

175. Mihara, M., & Uchiyama, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, 86(1), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
176. Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Yamada, M., & Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca²⁺ influx. *The Journal of biological chemistry*, 286(45), 39379–39386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.298208>
177. Mikami, Y., Shibuya, N., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2013). Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ -lyase at the steady-state low intracellular Ca(2+) concentrations. *Biochemical and biophysical research communications*, 431(2), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.010>
178. Milazzo, V., Cosentino, N., Trombara, F., & Marenzi, G. (2024). Vitamin D and cardiovascular diseases. *Advances in food and nutrition research*, 109, 68–91. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2023.12.005>
179. Misgar, R. A., Sahu, D., Bhat, M. H., Wani, A. I., & Bashir, M. I. (2019). Vitamin D Toxicity: A Prospective Study from a Tertiary Care Centre in Kashmir Valley. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 23(3), 363–366. https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_116_19
180. Mozos, I., & Marginean, O. (2015). Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. *BioMed research international*, 2015, 109275. <https://doi.org/10.1155/2015/109275>
181. Munteanu, C., Popescu, C., Vlădulescu-Trandafir, A. I., & Onose, G. (2024). Signaling Paradigms of H₂S-Induced Vasodilation: A Comprehensive Review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 13(10), 1158. <https://doi.org/10.3390/antiox13101158>
182. Neelankal John, A., Iqbal, Z., Colley, S., Morahan, G., Makishima, M., & Jiang, F. X. (2018). Vitamin D receptor-targeted treatment to prevent pathological dedifferentiation of pancreatic β cells under hyperglycaemic stress. *Diabetes & metabolism*, 44(3), 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2017.07.006>

183. Norman, P. E., & Powell, J. T. (2014). Vitamin D and cardiovascular disease. *Circulation research*, *114*(2), 379–393. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301241>
184. Novelli, E. L., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A. A., Cicogna, A. C., & Novelli Filho, J. L. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*, *41*(1), 111–119. <https://doi.org/10.1258/00236770779399518>
185. Nowak, J. I., Olszewska, A. M., Król, O., & Żmijewski, M. A. (2023). Protein Disulfide Isomerase Family A Member 3 Knockout Abrogate Effects of Vitamin D on Cellular Respiration and Glycolysis in Squamous Cell Carcinoma. *Nutrients*, *15*(21), 4529. <https://doi.org/10.3390/nu15214529>
186. Nowak, J. I., Olszewska, A. M., Wierzbicka, J. M., Gebert, M., Bartoszewski, R., & Żmijewski, M. A. (2023). VDR and PDIA3 Are Essential for Activation of Calcium Signaling and Membrane Response to 1,25(OH)₂D₃ in Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cells*, *13*(1), 11. <https://doi.org/10.3390/cells1301001>
187. Oliveira, B. M., de Almeida, L. F., Deluque, A. L., Souza, C. S., Maciel, A. L. D., Francescato, H. D. C., Costa, R. S., Giovanini, C., de Paula, F. J. A., & Coimbra, T. M. (2022). Calcitriol Reduces the Inflammation, Endothelial Damage and Oxidative Stress in AKI Caused by Cisplatin. *International journal of molecular sciences*, *23*(24), 15877. <https://doi.org/10.3390/ijms232415877>
188. Olson K. R. (2018). H₂S and polysulfide metabolism: Conventional and unconventional pathways. *Biochemical pharmacology*, *149*, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.010>
189. Olson, K. R., Deleon, E. R., Gao, Y., Hurley, K., Sadauskas, V., Batz, C., & Stoy, G. F. (2013). Thiosulfate: a readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *American journal of physiology. Regulatory*,

- integrative and comparative physiology*, 305(6), R592–R603.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00421.2012>
190. Ostrenyuk, R., Bobetska, O., & Zaichko, N. (2024). The influence of calcitriol on the level of visfatin in the heart of rats with experimental obesity. У Г. О. Ушакова (За заг. ред.), *Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології: матеріали VII Міжнародної наукової конференції, м. Дніпро, 3-4 жовтня, 2024* (С. 145-146). ДНУ.
https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2024/10/zbirnyk-Dnipro-3_4-Oct-2024.pdf
191. Ostrenyuk, R., Samborska, I., & Zaichko, N. (2022). Influence of calcitriol on the morphological state of the aorta of rats under conditions of inhibition on the hydrogen sulfide / cystathionine-gamma-lyase system. In *Materials of the 6th international scientific conference «Current problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology»* (P. 147-148). Dnipro.
<https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2022/10/Abstract-book-Dnipro-2022.pdf>
192. Ozorowski, M., Wiciński, M., Wróbel, Ł., & Fajkiel-Madajczyk, A. (2022). Cholecalciferol supplementation lowers leptin and TMAO but increases NO and VEGF-A levels in obese vitamin D deficient patients: Is it one of the potential cardioprotective mechanisms of vitamin D?. *Nutrition & metabolism*, 19(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00666-4>
193. Pál, É., Ungvári, Z., Benyó, Z., & Várбірó, S. (2023). Role of Vitamin D Deficiency in the Pathogenesis of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases. *Nutrients*, 15(2), 334. <https://doi.org/10.3390/nu15020334>
194. Pan, L. L., Qin, M., Liu, X. H., & Zhu, Y. Z. (2017). The Role of Hydrogen Sulfide on Cardiovascular Homeostasis: An Overview with Update on Immunomodulation. *Frontiers in pharmacology*, 8, 686.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00686>
195. Park, C. Y., Shin, Y., Kim, J. H., Zhu, S., Jung, Y. S., & Han, S. N. (2020). Effects of high fat diet-induced obesity on vitamin D metabolism and

- tissue distribution in vitamin D deficient or supplemented mice. *Nutrition & metabolism*, 17, 44. <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00463-x>
196. Parsanathan, R., & Jain, S. K. (2019). Glutathione deficiency induces epigenetic alterations of vitamin D metabolism genes in the livers of high-fat diet-fed obese mice. *Scientific reports*, 9(1), 14784. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51377-5>
197. Patel, D., Druck, A., Hoppensteadt, D., Bansal, V., Brailovsky, Y., Syed, M., & Fareed, J. (2020). Relationship Between 25-Hydroxyvitamin D, Renin, and Collagen Remodeling Biomarkers in Atrial Fibrillation. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 26, 1076029619899702. <https://doi.org/10.1177/1076029619899702>
198. Pawlukianiec, C., Lauko, K. K., Michalak, D., Żendzian-Piotrowska, M., Zalewska, A., & Maciejczyk, M. (2025). A comparative study on the antioxidant and antiglycation properties of different vitamin D forms. *European journal of medicinal chemistry*, 285, 117263. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117263>
199. Peng, S., Zhao, D., Li, Q., Wang, M., Zhang, S., Pang, K., Huang, J., Lu, F., Chen, H., & Zhang, W. (2022). Hydrogen Sulfide Regulates SERCA2a Ubiquitylation via Muscle RING Finger-1 S-Sulfhydration to Affect Cardiac Contractility in db/db Mice. *Cells*, 11(21), 3465. <https://doi.org/10.3390/cells11213465>
200. Pérez-Torres, I., Castrejón-Téllez, V., Soto, M. E., Rubio-Ruiz, M. E., Manzano-Pech, L., & Guarner-Lans, V. (2021). Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1786. <https://doi.org/10.3390/ijms22041786>
201. Pike, J. W., & Meyer, M. B. (2014). Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 144 Pt A, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.11.004>

202. Pilz, S., Trummer, C., Theiler-Schwetz, V., Grübler, M. R., Verheyen, N. D., Odler, B., Karras, S. N., Zittermann, A., & März, W. (2022). Critical Appraisal of Large Vitamin D Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, *14*(2), 303. <https://doi.org/10.3390/nu14020303>
203. Pineda-Lancheros, L. E., Gálvez-Navas, J. M., Rojo-Tolosa, S., Membrive-Jiménez, C., Valverde-Merino, M. I., Martínez-Martínez, F., Sánchez-Martín, A., Ramírez-Tortosa, M., Pérez-Ramírez, C., & Jiménez-Morales, A. (2023). Polymorphisms in VDR, CYP27B1, CYP2R1, GC and CYP24A1 Genes as Biomarkers of Survival in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review. *Nutrients*, *15*(6), 1525. <https://doi.org/10.3390/nu15061525>
204. Piragine, E., Citi, V., Lawson, K., Calderone, V., & Martelli, A. (2022). Potential Effects of Natural H₂S-Donors in Hypertension Management. *Biomolecules*, *12*(4), 581. <https://doi.org/10.3390/biom12040581>
205. Platt, I., Bisgin, A., & Kilavuz, S. (2023). Ethylmalonic Encephalopathy: a literature review and two new cases of mild phenotype. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, *44*(11), 3827–3852. <https://doi.org/10.1007/s10072-023-06904-8>
206. Porta, M., & Striglia, E. (2020). Intravitreal anti-VEGF agents and cardiovascular risk. *Internal and emergency medicine*, *15*(2), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s11739-019-02253-7>
207. Prabhu, A. V., Luu, W., Li, D., Sharpe, L. J., & Brown, A. J. (2016). DHCR7: A vital enzyme switch between cholesterol and vitamin D production. *Progress in lipid research*, *64*, 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.09.003>
208. Ramasamy I. (2020). Vitamin D Metabolism and Guidelines for Vitamin D Supplementation. *The Clinical biochemist. Reviews*, *41*(3), 103–126. <https://doi.org/10.33176/AACB-20-00006>

209. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71–85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280562>
210. Renke, G., Starling-Soares, B., Baesso, T., Petronio, R., Aguiar, D., & Paes, R. (2023). Effects of Vitamin D on Cardiovascular Risk and Oxidative Stress. *Nutrients*, 15(3), 769. <https://doi.org/10.3390/nu15030769>
211. Roizen, J. D., Long, C., Casella, A., O'Lear, L., Caplan, I., Lai, M., Sasson, I., Singh, R., Makowski, A. J., Simmons, R., & Levine, M. A. (2019). Obesity Decreases Hepatic 25-Hydroxylase Activity Causing Low Serum 25-Hydroxyvitamin D. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 34(6), 1068–1073. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3686>
212. Safari, F., Zarei, F., Shekarforoush, S., Fekri, A., Klishadi, M. S., & Hekmatimoghaddam, S. (2015). Combined 1,25-Dihydroxy-vitamin D and Resveratrol: A Novel Therapeutic Approach to Ameliorate Ischemia Reperfusion-Induced Myocardial Injury. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 85(3-4), 174–184. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000236>
213. Saito, H., Takeda, S., & Amizuka, N. (2013). Eldecalcitol and calcitriol stimulates 'bone minimodeling,' focal bone formation without prior bone resorption, in rat trabecular bone. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 136, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.10.004>
214. Salehpour, A., Hedayati, M., Shidfar, F., Neshatbini Tehrani, A., Farshad, A. A., & Mohammadi, S. (2021). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates adipogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells dose-dependently. *Nutrition & metabolism*, 18(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12986-021-00561-4>

215. Salimi, A., Minouei, M., Niknejad, M., & Mojarad Aylar, E. (2021). Antioxidant activity of calcitriol reduces direct methamphetamine-induced mitochondrial dysfunction in isolated rat heart mitochondria. *Toxin Reviews*, *41*(4), 1139–1147. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1978499>
216. Santos, S. S., Rodrigues, L. O. C. P., Martins, V., Petrosino, M., Zuhra, K., Ascensão, K., Anand, A., Abdel-Kader, R. M., Gad, M. Z., Bourquin, C., & Szabo, C. (2023). Role of Cystathionine β -Synthase and 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase in the Regulation of Proliferation, Migration, and Bioenergetics of Murine Breast Cancer Cells. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *12*(3), 647. <https://doi.org/10.3390/antiox12030647>
217. Santos-Martínez, N., Díaz, L., Ortiz-Ortega, V. M., Ordaz-Rosado, D., Prado-Garcia, H., Avila, E., Larrea, F., & García-Becerra, R. (2021). Calcitriol induces estrogen receptor α expression through direct transcriptional regulation and epigenetic modifications in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *American journal of cancer research*, *11*(12), 5951–5964. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8727803/>
218. Saponaro, F., Saba, A., & Zucchi, R. (2020). An Update on Vitamin D Metabolism. *International journal of molecular sciences*, *21*(18), 6573. <https://doi.org/10.3390/ijms21186573>
219. Scheid, S., Goeller, M., Baar, W., Wollborn, J., Buerkle, H., Schlunck, G., Lagrèze, W., Goebel, U., & Ulbrich, F. (2021). Hydrogen Sulfide Reduces Ischemia and Reperfusion Injury in Neuronal Cells in a Dose- and Time-Dependent Manner. *International journal of molecular sciences*, *22*(18), 10099. <https://doi.org/10.3390/ijms221810099>
220. Schütze, N., Fritsche, J., Ebert-Dümig, R., Schneider, D., Köhrle, J., Andreesen, R., Kreutz, M., & Jakob, F. (1999). The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells--regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and selenite. *BioFactors (Oxford, England)*, *10*(4), 329–338. <https://doi.org/10.1002/biof.5520100403>

221. Şelli, M. E., Wick, G., Wraith, D. C., & Newby, A. C. (2017). Autoimmunity to HSP60 during diet induced obesity in mice. *International journal of obesity* (2005), *41*(2), 348–351. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.216>
222. Sergeev I. N. (2020). Vitamin D Status and Vitamin D-Dependent Apoptosis in Obesity. *Nutrients*, *12*(5), 1392. <https://doi.org/10.3390/nu12051392>
223. Shahid, A., & Bhatia, M. (2024). Hydrogen Sulfide: A Versatile Molecule and Therapeutic Target in Health and Diseases. *Biomolecules*, *14*(9), 1145. <https://doi.org/10.3390/biom14091145>
224. Shahrzad, M. K., Gharehgozlou, R., Fadaei, S., Hajian, P., & Mirzaei, H. R. (2021). Vitamin D and Non-coding RNAs: New Insights into the Regulation of Breast Cancer. *Current molecular medicine*, *21*(3), 194–210. <https://doi.org/10.2174/1566524020666200712182137>
225. Shangguan, J., Wu, T., Tian, L., Liu, Y., Zhu, L., Liu, R., Zhu, J., Shi, L., Zhao, M., & Ren, A. (2024). Hydrogen sulfide maintains mitochondrial homeostasis and regulates ganoderic acids biosynthesis by SQR under heat stress in *Ganoderma lucidum*. *Redox biology*, *74*, 103227. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103227>
226. Shen, X. H., Tang, Q. Y., Huang, J., & Cai, W. (2010). Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), *235*(1), 47–51. <https://doi.org/10.1258/ebm.2009.009122>
227. Shen, Y., Shen, Z., Luo, S., Guo, W., & Zhu, Y. Z. (2015). The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2015*, 925167. <https://doi.org/10.1155/2015/925167>
228. Sikura, K. É., Potor, L., Szerafin, T., Oros, M., Nagy, P., Méhes, G., Hendrik, Z., Zarjou, A., Agarwal, A., Posta, N., Torregrossa, R., Whiteman, M., Fürtös, I., Balla, G., & Balla, J. (2020). Hydrogen sulfide inhibits

- calcification of heart valves; implications for calcific aortic valve disease. *British journal of pharmacology*, 177(4), 793–809.
<https://doi.org/10.1111/bph.14691>
229. Slominski, A. T., Chaiprasongsuk, A., Janjetovic, Z., Kim, T. K., Stefan, J., Slominski, R. M., Hanumanthu, V. S., Raman, C., Qayyum, S., Song, Y., Song, Y., Panich, U., Crossman, D. K., Athar, M., Holick, M. F., Jetten, A. M., Zmijewski, M. A., Zmijewski, J., & Tuckey, R. C. (2020). Photoprotective Properties of Vitamin D and Lumisterol Hydroxyderivatives. *Cell biochemistry and biophysics*, 78(2), 165–180.
<https://doi.org/10.1007/s12013-020-00913-6>
230. Slominski, A. T., Kim, T. K., Slominski, R. M., Song, Y., Janjetovic, Z., Podgorska, E., Reddy, S. B., Song, Y., Raman, C., Tang, E. K. Y., Fabisiak, A., Brzeminski, P., Sicinski, R. R., Atigadda, V., Jetten, A. M., Holick, M. F., & Tuckey, R. C. (2022). Metabolic activation of tachysterol₃ to biologically active hydroxyderivatives that act on VDR, AhR, LXRs, and PPAR γ receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(8), e22451.
<https://doi.org/10.1096/fj.202200578R>
231. Song, Y. J., Zhong, C. B., & Wang, X. B. (2019). Heat shock protein 70: A promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of cellular physiology*, 234(2), 1190–1207.
<https://doi.org/10.1002/jcp.27110>
232. Song, Q., & Sergeev, I. N. (2015). High vitamin D and calcium intakes increase bone mineral (Ca and P) content in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 35(2), 146–154.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.11.003>
233. Song, X., Nie, L., Long, J., Zhao, J., Liu, X., Wang, L., Liu, D., Wang, S., Liu, S., & Yang, J. (2023). Hydrogen sulfide alleviates hypothyroidism-induced myocardial fibrosis in rats through stimulating autophagy and inhibiting TGF- β 1/Smad2 pathway. *The Korean journal of physiology &*

- pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 27(1), 1–8.
<https://doi.org/10.4196/kjpp.2023.27.1.1>
234. Song, Y. J., Zhong, C. B., & Wang, X. B. (2019). Heat shock protein 70: A promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of cellular physiology*, 234(2), 1190–1207.
<https://doi.org/10.1002/jcp.27110>
235. Stachowicz, A., Czepiel, K., Wiśniewska, A., Stachyra, K., Ulatowska-Białas, M., Kuśnierz-Cabala, B., Surmiak, M., Majka, G., Kuś, K., Wood, M. E., Torregrossa, R., Whiteman, M., & Olszanecki, R. (2024). Mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor reduces fatty liver and obesity in mice fed a high fat diet by inhibiting de novo lipogenesis and inflammation via mTOR/SREBP-1 and NF-κB signaling pathways. *Pharmacological research*, 209, 107428. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107428>
236. Stipanuk, M. H., & Beck, P. W. (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *The Biochemical journal*, 206(2), 267–277. <https://doi.org/10.1042/bj2060267>
237. Sun, X., Liu, N., Sun, C., Xu, Y., Ding, D., & Kong, J. (2023). The inhibitory effect of vitamin D on myocardial homocysteine levels involves activation of Nrf2-mediated methionine synthase. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 231, 106303.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106303>
238. Sung, Y. Y., Kim, S. H., Yoo, B. W., & Kim, H. K. (2015). The nutritional composition and anti-obesity effects of an herbal mixed extract containing *Allium fistulosum* and *Viola mandshurica* in high-fat-diet-induced obese mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 370.
<https://doi.org/10.1186/s12906-015-0875-1>
239. Sutedja, E. K., Amarassaphira, D., Goenawan, H., Susanti Pratiwi, Y., Sylviana, N., Setiabudiawan, B., Suwarsa, O., Tina Dewi Judistiani, R., Supratman, U., & Lesmana, R. (2022). Calcitriol Inhibits Proliferation and

- Potentially Induces Apoptosis in B16-F10 Cells. *Medical science monitor basic research*, 28, e935139. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.935139>
240. Szlęzak, D., Hutsch, T., Ufnal, M., & Wróbel, M. (2022). Heart and kidney H₂S production is reduced in hypertensive and older rats. *Biochimie*, 199, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.04.013>
241. Szymczak-Pajor, I., Miazek, K., Selmi, A., Balcerczyk, A., & Śliwińska, A. (2022). The Action of Vitamin D in Adipose Tissue: Is There the Link between Vitamin D Deficiency and Adipose Tissue-Related Metabolic Disorders?. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 956. <https://doi.org/10.3390/ijms23020956>
242. Szymczak-Pajor, I., & Śliwińska, A. (2019). Analysis of Association between Vitamin D Deficiency and Insulin Resistance. *Nutrients*, 11(4), 794. <https://doi.org/10.3390/nu11040794>
243. Thiebaut, C., Vlaeminck-Guillem, V., Trédan, O., Poulard, C., & Le Romancer, M. (2021). Non-genomic signaling of steroid receptors in cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 538, 111453. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111453>
244. Tkach, S., Pankiv, V., & Pankiv, I. (2022). Modern views on the metabolism and biological effects of vitamin D. *International journal of endocrinology (Ukraine)*, 18(2), 109–117. <https://doi.org/10.22141/2224-0721.18.2.2022.1156>
245. Tukaj, S., Trzonkowski, P., & Tukaj, C. (2012). Regulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on vascular smooth muscle cells. *Acta biochimica Polonica*, 59(3), 395–400. PMID: 22910558
246. Velimirović, M., Jevtić Dožudić, G., Selaković, V., Stojković, T., Puškaš, N., Zaletel, I., Živković, M., Dragutinović, V., Nikolić, T., Jelenković, A., Djorović, D., Mirčić, A., & Petronijević, N. D. (2018). Effects of Vitamin D₃ on the NADPH Oxidase and Matrix Metalloproteinase 9 in an Animal Model of Global Cerebral Ischemia. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 3273654. <https://doi.org/10.1155/2018/3273654>

247. Verdoia, M., Nardin, M., Gioscia, R., Saghir Afifeh, A. M., Viglione, F., Negro, F., Marcolongo, M., De Luca, G., & Novara Atherosclerosis Study Group (NAS) (2021). Association between vitamin D deficiency and serum Homocysteine levels and its relationship with coronary artery disease. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 52(2), 523–531. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02391-w>
248. Voutsadakis I. A. (2020). Vitamin D receptor (VDR) and metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24A1 in breast cancer. *Molecular biology reports*, 47(12), 9821–9830. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05780-1>
249. Vranić, L., Mikolašević, I., & Milić, S. (2019). Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity?. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(9), 541. <https://doi.org/10.3390/medicina55090541>
250. Wang, F. Z., Zhou, H., Wang, H. Y., Dai, H. B., Gao, Q., Qian, P., & Zhou, Y. B. (2021). Hydrogen sulfide prevents arterial medial calcification in rats with diabetic nephropathy. *BMC cardiovascular disorders*, 21(1), 495. <https://doi.org/10.1186/s12872-021-02307-9>
251. Wang, M., Tang, J., Zhang, S., Pang, K., Zhao, Y., Liu, N., Huang, J., Kang, J., Dong, S., Li, H., Tian, Z., Duan, B., Lu, F., & Zhang, W. (2023). Exogenous H₂S initiating Nrf2/GPx4/GSH pathway through promoting Syvn1-Keap1 interaction in diabetic hearts. *Cell death discovery*, 9(1), 394. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01690-w>
252. Wang, W. L., Ge, T. Y., Chen, X., Mao, Y., & Zhu, Y. Z. (2020). Advances in the Protective Mechanism of NO, H₂S, and H₂ in Myocardial Ischemic Injury. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 7, 588206. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.588206>
253. Wee, C. L., Mokhtar, S. S., Singh, K. K. B., Yahaya, S., Leung, S. W. S., & Rasool, A. H. G. (2021). Calcitriol Supplementation Ameliorates Microvascular Endothelial Dysfunction in Vitamin D-Deficient Diabetic Rats by Upregulating the Vascular eNOS Protein Expression and Reducing

- Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 3109294. <https://doi.org/10.1155/2021/3109294>
254. Wee, C. L., Mokhtar, S. S., Banga Singh, K. K., & Rasool, A. H. G. (2021). Vitamin D deficiency attenuates endothelial function by reducing antioxidant activity and vascular eNOS expression in the rat microcirculation. *Microvascular research*, 138, 104227. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104227>
255. Wee, C. L., Mokhtar, S. S., Singh, K. K. B., Yahaya, S., Leung, S. W. S., & Rasool, A. H. G. (2021). Calcitriol Supplementation Ameliorates Microvascular Endothelial Dysfunction in Vitamin D-Deficient Diabetic Rats by Upregulating the Vascular eNOS Protein Expression and Reducing Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 3109294. <https://doi.org/10.1155/2021/3109294>
256. Wetzels, C., Pfeffer, T., Bulkescher, R., Zemva, J., Modafferi, S., Polimeni, A., Salinaro, A. T., Calabrese, V., Schmitt, C. P., & Peters, V. (2022). Anserine and Carnosine Induce HSP70-Dependent H₂S Formation in Endothelial Cells and Murine Kidney. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(1), 66. <https://doi.org/10.3390/antiox12010066>
257. Wiliński, B., Wiliński, J., Somogyi, E., Piotrowska, J., & Góralaska, M. (2011). Atorvastatin affects the tissue concentration of hydrogen sulfide in mouse kidneys and other organs. *Pharmacological reports: PR*, 63(1), 184–188. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(11\)70414-5](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(11)70414-5)
258. Wiliński, B., Wiliński, J., Somogyi, E., Piotrowska, J., & Opoka, W. (2012). Vitamin D₃ (cholecalciferol) boosts hydrogen sulfide tissue concentrations in heart and other mouse organs. *Folia biologica*, 60(3-4), 243–247. https://doi.org/10.3409/fb60_3-4.243-247
259. Wilkie, S. E., Borland, G., Carter, R. N., Morton, N. M., & Selman, C. (2021). Hydrogen sulfide in ageing, longevity and disease. *The Biochemical journal*, 478(19), 3485–3504. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210517>

260. Wimalawansa S. J. (2023). Physiological Basis for Using Vitamin D to Improve Health. *Biomedicines*, *11*(6), 1542. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061542>
261. Wimalawansa S. J. (2024). Physiology of Vitamin D-Focusing on Disease Prevention. *Nutrients*, *16*(11), 1666. <https://doi.org/10.3390/nu16111666>
262. Wood R. J. (2008). Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutrition reviews*, *66*(1), 40–46. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.00004.x>
263. Wu, D., Gu, Y., & Zhu, D. (2021). Cardioprotective effects of hydrogen sulfide in attenuating myocardial ischemia reperfusion injury (Review). *Molecular medicine reports*, *24*(6), 875. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12515>
264. Xiao, L., Dong, J. H., Teng, X., Jin, S., Xue, H. M., Liu, S. Y., Guo, Q., Shen, W., Ni, X. C., & Wu, Y. M. (2018). Hydrogen sulfide improves endothelial dysfunction in hypertension by activating peroxisome proliferator-activated receptor delta/endothelial nitric oxide synthase signaling. *Journal of hypertension*, *36*(3), 651–665. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001605>
265. Xiao, T., Chen, S., Yan, G., Zheng, J., Qiu, Q., Lin, S., Zong, Y., Chang, H., Yu Chang, A. C., Wu, Y., & Hou, C. (2024). Cystathionine γ -lyase inhibits mitochondrial oxidative stress by releasing H₂S nearby through the AKT/NRF2 signaling pathway. *Frontiers in pharmacology*, *15*, 1374720. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1374720>
266. Ji, X., Jin, S., Wang, Y., Chen, Y., & Zhang, J. (2022, May). Visfatin and 25-Hydroxyvitamin D3 Levels Affect Coronary Collateral Circulation Development in Patients with Chronic Coronary Total Occlusion. *Cardiovascular Innovations and Applications*, *6*(3), 161–169. <https://doi.org/10.15212/CVIA.2021.0032>

267. Xie, L., Wu, H., He, Q., Shi, W., Zhang, J., Xiao, X., & Yu, T. (2024). A slow-releasing donor of hydrogen sulfide inhibits neuronal cell death via anti-PANoptosis in rats with spinal cord ischemia–reperfusion injury. *Cell communication and signaling : CCS*, 22(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01457-x>
268. Xie, Z., Chen, J., Zheng, C., Wu, J., Cheng, Y., Zhu, S., Lin, C., Cao, Q., Zhu, J., & Jin, T. (2017). 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. *Immunology*, 152(3), 414–424. <https://doi.org/10.1111/imm.12776>
269. Yang, S., Wang, C., Ruan, C., Chen, M., Cao, R., Sheng, L., Chang, N., Xu, T., Zhao, P., Liu, X., Zhu, F., Xiao, Q., & Gao, S. (2022). Novel Insights into the Cardioprotective Effects of Calcitriol in Myocardial Infarction. *Cells*, 11(10), 1676. <https://doi.org/10.3390/cells11101676>
270. Yang, R., Teng, X., Li, H., Xue, H. M., Guo, Q., Xiao, L., & Wu, Y. M. (2016). Hydrogen Sulfide Improves Vascular Calcification in Rats by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 9095242. <https://doi.org/10.1155/2016/9095242>
271. Ye, X., Li, Y., Lv, B., Qiu, B., Zhang, S., Peng, H., Kong, W., Tang, C., Huang, Y., Du, J., & Jin, H. (2022). Endogenous Hydrogen Sulfide Persulfidates Caspase-3 at Cysteine 163 to Inhibit Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Apoptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, 6153772. <https://doi.org/10.1155/2022/6153772>
272. Yin, Y., Yu, Z., Xia, M., Luo, X., Lu, X., & Ling, W. (2012). Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *European journal of clinical investigation*, 42(11), 1189–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x>
273. Yoo, T. K., Rhim, H. C., Lee, Y. T., Yoon, K. J., & Park, C. H. (2022). Relationship between hyperhomocysteinemia and coexisting obesity with low

- skeletal muscle mass in asymptomatic adult population. *Scientific reports*, 12(1), 12439. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16401-1>
274. Yu, L., Luo, Q., Rao, X., Xiao, X., & Wang, P. (2025). Unveiling the anti-inflammatory mechanism of exogenous hydrogen sulfide in Kawasaki disease based on network pharmacology and experimental validation. *Scientific reports*, 15(1), 7410. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-91998-7>
275. Yu, W. D., Ma, Y., Flynn, G., Muindi, J. R., Kong, R. X., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2010). Calcitriol enhances gemcitabine anti-tumor activity in vitro and in vivo by promoting apoptosis in a human pancreatic carcinoma model system. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(15), 3022–3029. <https://doi.org/10.4161/cc.9.15.12381>
276. Zaichko, N. V., Melnik, A. V., Yoltukhivskyy, M. M., Olhovskiy, A. S., & Palamarchuk, I. V. (2014). Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 86(5), 5–25. <https://doi.org/10.15407/ubj86.05.005>
277. Zaichko, N. V., Palamarchuk, I. V., Blazhchenko, V. V., Ostrenyuk, R. S., & Bobetska O. P. (2019). Age related changes in hydrogen sulfide metabolism in rats organs: connection with mediators of angiogenesis. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. (с. 187–188). Медична та клінічна хімія, 21(3, додаток). ТДМУ «Укрмедкнига». <http://www.biochemistry.org.ua/index.php/uk/ubs-societynewsua/5590-11-10-2019-30-04-2019>
278. Zaichko, N.V., Palamarchuk, I.V., Blazhchenko, V.V., & Ostrenyuk, R.S. (2018). The hydrogen sulfide system disturbances: ethiology and pathogenetic effects. In *2nd Symposium Innovation in Medicine Smartlion-2018, 11-13 October 2018* (P. 46-47). Lviv.
279. Zaulkffali, A. S., Md Razip, N. N., Syed Alwi, S. S., Abd Jalil, A., Abd Mutalib, M. S., Gopalsamy, B., Chang, S. K., Zainal, Z., Ibrahim, N. N., Zakaria, Z. A., & Khaza'ai, H. (2019). Vitamins D and E Stimulate the *PI3K*-

- AKT Signalling Pathway in Insulin-Resistant SK-N-SH Neuronal Cells. Nutrients, 11(10), 2525. <https://doi.org/10.3390/nu11102525>*
280. Zhang, H., Pan, J., Huang, S., Chen, X., Chang, A. C. Y., Wang, C., Zhang, J., & Zhang, H. (2024). Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from doxorubicin-induced ferroptosis through the SLC7A11/GSH/GPx4 pathway by Keap1 S-sulfhydration and Nrf2 activation. *Redox biology, 70*, 103066. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103066>
281. Zhang, H., Zhuang, X. D., Meng, F. H., Chen, L., Dong, X. B., Liu, G. H., Li, J. H., Dong, Q., Xu, J. D., & Yang, C. T. (2016). Calcitriol prevents peripheral RSC96 Schwann neural cells from high glucose & methylglyoxal-induced injury through restoration of CBS/H₂S expression. *Neurochemistry international, 92*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.12.005>
282. Zhang, J., Jing, Q., Gao, F., Zhang, F., Pei, D., Di, D., & Hai, J. (2024). Review of Hydrogen Sulfide Based on Its Activity Mechanism and Fluorescence Sensing. *Targets, 2(3)*, 202-223. <https://doi.org/10.3390/targets2030012>
283. Zhang, J., Wang, H., & Sun, X. (2021). Sevoflurane Postconditioning Reduces Hypoxia/Reoxygenation Injury in Cardiomyocytes via Upregulation of Heat Shock Protein 70. *Journal of microbiology and biotechnology, 31(8)*, 1069–1078. <https://doi.org/10.4014/jmb.2103.03040>
284. Zhang, M. L., Peng, W., Ni, J. Q., & Chen, G. (2021). Recent advances in the protective role of hydrogen sulfide in myocardial ischemia/reperfusion injury: a narrative review. *Medical gas research, 11(2)*, 83–87. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.311499>
285. Zhang, R., Sun, Y., Tsai, H., Tang, C., Jin, H., & Du, J. (2012). Hydrogen sulfide inhibits L-type calcium currents depending upon the protein sulfhydryl state in rat cardiomyocytes. *PloS one, 7(5)*, e37073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037073>
286. Zhang, S., Cheng, Y., Guan, Y., Wen, J., & Chen, Z. (2024). Hydrogen Sulfide Exerted a Pro-Angiogenic Role by Promoting the Phosphorylation of

- VEGFR2 at Tyr797 and Ser799 Sites in Hypoxia-Reoxygenation Injury. *International journal of molecular sciences*, 25(8), 4340. <https://doi.org/10.3390/ijms25084340>
287. Zhang, Y. X., Jing, M. R., Cai, C. B., Zhu, S. G., Zhang, C. J., Wang, Q. M., Zhai, Y. K., Ji, X. Y., & Wu, D. D. (2023). Role of hydrogen sulphide in physiological and pathological angiogenesis. *Cell proliferation*, 56(3), e13374. <https://doi.org/10.1111/cpr.13374>
288. Zhao, M., Cheng, Y., Wang, X., Cui, X., Cheng, X., Fu, Q., Song, Y., Yu, P., Liu, Y., & Yu, Y. (2022). Hydrogen Sulfide Attenuates High-Fat Diet-Induced Obesity: Involvement of mTOR/IKK/NF- κ B Signaling Pathway. *Molecular neurobiology*, 59(11), 6903–6917. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03004-0>
289. Zheng, G., Wen, N., Pan, M., Huang, Y., & Li, Z. (2019). Biologically active 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against experimental sepsis by negatively regulating the Toll-like receptor 4/myeloid differentiation primary response gene 88/Toll-IL-1 resistance-domain-containing adapter-inducing interferon- β signaling pathway. *International journal of molecular medicine*, 44(3), 1151–1160. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4266>
290. Zhou, X., Cao, Y., Ao, G., Hu, L., Liu, H., Wu, J., Wang, X., Jin, M., Zheng, S., Zhen, X., Alkayed, N. J., Jia, J., & Cheng, J. (2014). CaMKK β -dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of hydrogen sulfide on neuroinflammation. *Antioxidants & redox signaling*, 21(12), 1741–1758. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5587>
291. Zhu, J., Jin, M., Wang, J., Zhang, H., Wu, Y., Li, D., Ji, X., Yang, H., Yin, C., Ren, T., & Xing, J. (2018). TNF α induces Ca²⁺ influx to accelerate extrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 37(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0714-6>
292. Zhu, L., Duan, W., Wu, G., Zhang, D., Wang, L., Chen, D., Chen, Z., & Yang, B. (2020). Protective effect of hydrogen sulfide on endothelial cells

- through Sirt1-FoxO1-mediated autophagy. *Annals of translational medicine*, 8(23), 1586. <https://doi.org/10.21037/atm-20-3647>
293. Zittermann, A., Frisch, S., Berthold, H. K., Götting, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Stehle, P., Koertke, H., & Koerfer, R. (2009). Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *The American journal of clinical nutrition*, 89(5), 1321–1327. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27004>
294. Żmijewski M. A. (2022). Nongenomic Activities of Vitamin D. *Nutrients*, 14(23), 5104. <https://doi.org/10.3390/nu14235104>

ДОДАТОК А

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В. (2022). Рівень гідроген сульфїду та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H_2S / цистатіонін-гама-ліаза. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 26(4), 550-556. **(Фахове видання України).**

Заїчко Н.В. – приймала участь в організації методології дослідження.

2. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів. *Медична та клінічна хімія*, 25(3), 5–12. **(Фахове видання України).**

Заїчко Н.В. – ідея роботи, допомога в статистичній обробці матеріалу та написанні висновків.

3. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В. (2023). Вплив кальцитріолу на показники апоптозу, запалення та оксидативного стресу в міокарді щурів за умов модуляції системи гідроген сульфїд / цистатіонін-гама-ліаза. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 27(4), 570–575. **(Фахове видання України).**

Заїчко Н.В. – консультативна допомога, критичний огляд та остаточне затвердження статті.

4. Остренюк, Р.С., Заїчко, Н.В. (2023). Роль системи H_2S / цистатіонін-γ-ліаза в механізмах кардіопротекторної дії вітаміну D за дієт-індукованого ожиріння. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 98(4), 35–41. **(Фахове видання України).**

Заїчко Н.В. – приймала участь в концептуалізації дослідження.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

5. Патент на корисну модель № 143133, Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01) A61K 31/38 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01). Спосіб корекції обміну гідрогену сульфїду за алїментарного ожирїння в експериментї / Заїчко Н.В., Блажченко В.В., Бобецька О.П., Штатько О.І., Остренюк Р.С. заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова. – № и 202000958; заявл. 14.02.2020; опубл. 10.07.2020, Бюл. № 13.

Заїчко Н.В. – приймала участь в організації дослідження.

Блажченко В.В. – приймав участь в концептуалізації дослідження.

Бобецька О.П. – приймала участь в перевірці даних дослідження.

Штатько О.І. – приймала участь організації методології дослідження.

6. Методика моделювання кардіоміопатії за експериментального ожирїння: свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір №122462 від 28.12.2023 / Бобецька О.П., Остренюк Р.С., Заїчко Н.В., Самборська І.А., Блажченко В.В.

Бобецька О.П. – приймала участь в концептуалізації дослідження.

Заїчко Н.В. – ідея роботи, допомога в статистичній обробці матеріалу.

Самборська І.А. – приймала участь в організації методології дослідження.

Блажченко В.В. – приймав участь в організації дослідження.

7. Методика підвищення кардіопротекторного ефекту вітаміну Д при порушеннях сульфїдного обміну за алїментарного ожирїння: свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір № 133891 від 27.02.2025 / Остренюк Р.С., Заїчко Н.В., Бобецька О.П., Блажченко В.В.

Заїчко Н.В. – приймала участь в організації дослідження.

Бобецька О.П. – приймала участь організації методології дослідження.

Блажченко В.В. – приймав участь в організації ресурсів дослідження.

8. Заїчко, Н., Остренюк, Р., Бобецька, О., Блажченко, В. (2025). Вплив кальцитріолу на соматометричні параметри та рівень вісфатину в сироватці крові щурів з дієтиндукованим ожирїнням за умов модуляції сульфїдного

обміну. *Перспективи та інновації науки. Серія «Медицина», № 10(56), 2533-2542. (Фахове видання України).*

Заїчко Н.В. – приймала участь концептуалізації дослідження.

Бобецька О.П. – приймала участь в організації ресурсів дослідження.

Блажченко В.В. – приймав участь організації методології дослідження.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

9. Остренюк Р.С., Блажченко В.В. Вплив високожирової дієти на вміст гідроген сульфїду в міокарді та нирках щурів. Матеріали наукової конференції «Перший крок в науку – 2017», м. Вінниця, 26-28 квітня 2017 р. С. 220-221. **(Тези).**

Блажченко В.В. – приймав участь в організації ресурсів дослідження.

10. Заїчко Н.В., Блажченко В.В., Остренюк Р.С. Аналіз впливу високожирової дієти на кінетичні параметри синтезу гідроген сульфїду в органах щурів. Матеріали LX науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ)», м. Тернопіль, 17 червня 2017 р. С. 288-290. **(Тези).**

Заїчко Н.В. – приймала участь в перевірці даних дослідження.

Блажченко В.В. – приймав участь в організації дослідження.

11. Blazhchenko V.V., Ostrenyuk R.S., Zaichko N.V. The activity of enzymes of transsulfuration in kidneys and myocardium of rats with experimental obesity. Abstract VIII Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, Lublin, Poland, 18-20 September 2017. P. 52. **(Тези).**

Blazhchenko V.V. – приймав участь в концептуалізації дослідження.

Zaichko N.V. – приймала участь в організації методології дослідження.

12. Остренюк Р.С. Стан системи гідроген сульфїд / цистатіонін-гама-ліаза в міокарді щурів за умов дефіциту вітаміну D3. Матеріали XVI міжнародної студентської наукової конференції «Перший крок в науку – 2019», м. Вінниця, 18-19 квітня 2019 р. С. 455-456. **(Тези).**

13. Zaichko N.V., Kachula S.O., Ostrenyuk R.S. Influence of calcitriol on desulfuration processes in myocardium of rats. Матеріали XII Українського

біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. С. 230. (Тези).

Zaichko N.V. – приймала участь в організації дослідження.

Kachula S.O. – приймав участь в концептуалізації дослідження.

14. Заїчко Н.В., Штатько О.І., Остренюк Р.С. Вплив кальцитріолу на стан системи гідроген сульфїду в міокарді щурів за гіпергомоцистеїнемїї. Матеріали Х Всеукраїнської науково-практичної конференції за участі міжнародних спеціалїстів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини», м. Вінниця, 7-8 листопада 2019 р. С. 159-160. (Тези).

Заїчко Н.В. – приймала участь в концептуалізації дослідження.

Штатько О.І. – приймала участь в візуалізації даних дослідження.

15. Zaichko N.V., Palamarchuk I.V., Blazhchenko V.V., Ostrenyuk R.S., Bobetska O.P. Age related changes in hydrogen sulfide metabolism in rats organs: connection with mediators of angiogenesis. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. С. 187–188. (Тези).

Zaichko N.V. – приймала участь в організації ресурсів дослідження.

Palamarchuk I.V. – приймала участь в візуалізації даних дослідження.

Blazhchenko V.V. – приймав участь в організації методології дослідження.

Bobetska O.P. – приймала участь в організації дослідження.

16. Ostrenyuk R., Samborska I., Zaichko N. Influence of calcitriol on the morphological state of the aorta of rats under conditions of inhibition on the hydrogen sulfide / cystathionine-gamma-lyase system. Materials of the 6th international scientific conference «Current problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology», Dnipro, 6-7 october 2022. P. 148-149. (Тези).

Samborska I. – приймала участь в візуалізації даних дослідження.

Zaichko N. – приймала участь в організації дослідження.

17. Заїчко Н.В., Бобецька О.П., Остренюк Р.С., Блажченко В.В. Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на продукцію медіаторів ліпогенезу в серцево-судинній системі щурів за дієт-індукованого ожиріння. Збірник

наукових праць XIX наукової конференції, присвяченої 150-річчю Наукового товариства ім. Шевченка «Львівські хімічні читання-2023», м. Львів, 29-31 травня 2023 р. С. 19. **(Тези)**.

Заїчко Н.В. – приймала участь в концептуалізації дослідження.

Бобецька О.П. – приймала участь в організації методології дослідження.

18. Остренюк Р.С., Заїчко Н.В. Роль гідроген сульфід у механізмах ендотеліопротекторної дії вітаміну D за експериментального ожиріння. Матеріали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції за участі міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Клінічна фармакологія сьогодення: шляхи максимальної допомоги лікарській спеціальності», м. Вінниця, 9-10 листопада 2023 р. С. 103-104. **(Тези)**.

Заїчко Н.В. – приймав участь в організації дослідження.

19. Остренюк Р.С., Заїчко Н.В. Вплив кальцитріолу на біохімічні зміни в аорті щурів в умовах інгібування системи гідроген сульфід / цистатіонін-гама-ліаза. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Бабенківські читання», м. Івано-Франківськ, 26-27 жовтня 2023 р. С. 65. **(Тези)**.

Заїчко Н.В. – приймала участь в концептуалізації дослідження.

20. Ostrenyuk R., Bobetska O., Zaichko N. The influence of calcitriol on the level of visfatin in the heart of rats with experimental obesity. Матеріали VII Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології», м. Дніпро, 3-4 жовтня 2024 р. С. 145-146. **(Тези)**.

Bobetska O. – приймала участь в візуалізації даних дослідження.

Zaichko N. – приймала участь в перевірці даних дослідження.

21. Остренюк Р.С., Заїчко Н.В., Блажченко В.В. Біохімічні зміни в серці щурів за дії кальцитріолу та модуляції сульфідного обміну. Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», м. Тернопіль, 23-25 жовтня 2024 р. С. 43. **(Тези)**.

Заїчко Н.В. – приймав участь в організації дослідження.

Блажченко В.В. – приймав участь в організації методології дослідження.

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. XIV міжнародна конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017» (Вінниця, 18-19 квітня, 2017, форма участі – *усна доповідь, публікація тез, диплом III ступеня*).
2. LX науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ)» (Тернопіль, 14 червня, 2017, форма участі – *публікація тез, постерна доповідь*).
3. VIII Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry (Lublin, 18-20 September 2017, форма участі – *публікація тез, постерна доповідь*).
4. XV міжнародна конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2018» (Вінниця, 18-20 квітня, 2018, форма участі – *публікація тез*).
5. 2-й міжнародний симпозіум «Innovation in Medicine SMART LION 2018» (Львів, 13-14 жовтня, 2018, форма участі – *публікація тез*).
6. XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня, 2019, форма участі – *постерна доповідь, публікація тез*).
7. XVI міжнародна конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2019» (Вінниця, 18-19 квітня, 2019, форма участі – *усна доповідь, публікація тез*).
8. Науково-практична мультидисциплінарна конференція «Досягнення сучасної медицини та фармакології на засадах медичної біохімії» (Вінниця, 17 жовтня, 2019, форма участі – *усна доповідь*).
9. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Бабенківські читання» (Івано-Франківськ, 24-25 жовтня, 2019, форма участі – *публікація тез*).
10. X Всеукраїнська науково-практична конференція за участі міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в

- фармакотерапії та профілактиці захворювань з позиції доказової медицини» (Вінниця, 7-8 листопада, 2019, форма участі – *усна доповідь, публікація тез*).
11. XVII міжнародна конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2020» (Вінниця, 28 листопада, 2020, форма участі – *публікація тез*).
 12. Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження проф. О.О. Столярчука «Актуальні питання фармакології та медичної біохімії» (Вінниця, 15-16 жовтня, 2020, форма участі – *усна доповідь*);
 13. VI Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (Дніпро, 6-7 жовтня, 2022, форма участі – *публікація тез*).
 14. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Бабенківські читання» (Івано-Франківськ, 26-27 жовтня, 2023, форма участі – *публікація тез*).
 15. XII Всеукраїнська науково-практична конференція за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Клінічна фармакологія сьогодення: шляхи максимальної допомоги лікарській спеціальності» (Вінниця, 9-10 листопада 2023, форма участі – *публікація тез*).
 16. XIX наукова конференція, присвячена 150-річчю Наукового товариства ім. Шевченка (м. Львів, 29-30 травня 2023, форма участі – *публікація тез*).
 17. VII Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (Дніпро, 3-4 жовтня 2024, форма участі – *публікація тез*).
 18. XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 23-25 жовтня 2024, форма участі – *публікація тез*).
 19. Наукова конференція молодих вчених - 2025 (Вінниця, 2025, форма участі – *усна доповідь, публікація тез*).

20. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Бабенківські читання» (Івано-Франківськ, 30-31 жовтня 2025, форма участі – *публікація тез*).
21. XIII Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Клінічна фармакологія як невід’ємне досягнення позитивного результату роботи лікаря та фармацевта» (м. Вінниця, 13-14 листопада 2025, форма участі – *публікація тез*).

ДОДАТОК Б

АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
та навчальної роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова

_____ д.мед.н., проф. Інна АНДРУШКО

“ 9 ” серпня _____ 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів та механізмах H₂S-залежної кардіопротекції.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Остренюк Роман Сергійович

3. Джерела інформації:

1. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2022) Рівень гідроген сульфїду та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гама-ліаза. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(4), 550-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05) 6

2. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів. Медична та клінічна хімія, 3, 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>

3. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профіброгенних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 98(4), 35-41. <https://doi.org/10.25040/ecpb2023.04.035>

4. Де і коли впроваджено: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка, 2024-2025 н.р.

5. Результати впровадження: у науково-навчальний процес

Використання результатів наукових досліджень Остренюка Р.С. у навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти щодо ролі активної форми вітаміну D у регуляції системи гідроген сульфїду в серцево-судинній системі, зокрема за умов ожиріння.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біохімії ім. професора О.О. Пентюка, протокол №15 від 1 серпня 2025 р.

Відповідальний за впровадження:

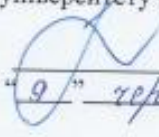
Завідувач кафедри біохімії
ім. професора О.О. Пентюка,
д.мед.н., професор ЗВО



Наталія ЗАІЧКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
та навчальної роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова

 д.мед.н., проф. Інна АНДРУШКО
"9" червня 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів та механізмах H₂S-залежної кардіопротекції.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Остренюк Роман Сергійович

3. Джерела інформації:

1. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2022) Рівень гідроген сульфїду та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гамма-ліаза. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(4), 550-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05) 6

2. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів. Медична та клінічна хімія, 3, 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>

3. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профіброгенних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 98(4), 35-41. <https://doi.org/10.25040/ecpb2023.04.035>

4. Де і коли впроваджено: кафедра фармакології, 2024-2025 н.р.

5. Результати впровадження: у науково-навчальний процес

Використання результатів наукових досліджень Остренюка Р. С. у науково-дослідному та навчальному процесі при проведенні практичних занять модулів «Засоби, що впливають на виконавчі органи» та «Засоби, що впливають на тканинний обмін» поглиблює обізнаність студентів щодо ролі вітаміну D та системи H₂S / цистатіонін-гамма-ліаза у регуляції функціонального стану серцево-судинної системи.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології, протокол № 10 від 10.04 2025 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакології
д.мед.н., професор ЗВО



Наталія ВОЛОЩУК

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
та навчальної роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова

д.мед.н., проф. Інна АНДРУШКО
" 9 " червня 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів та механізмах H₂S-залежної кардіопротекції.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Остренюк Роман Сергійович.

3. Джерела інформації:

1. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2022) Рівень гідроген сульфїду та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гама-ліаза. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(4), 550-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05) 6

2. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів. Медична та клінічна хімія, 3, 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>

3. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профібrogenних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 98(4), 35-41. <https://doi.org/10.25040/ecrb2023.04.035>

4. Де і коли впроваджено: кафедра медичної та біологічної хімії, 2024-2025 н.р.

5. Результати впровадження: у науково-навчальний процес

Використання результатів наукових досліджень Остренюка Р. С. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду та вітаміну D на активність маркерів запалення й фіброгенезу в серцево-судинній системі за ожиріння.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри, медичної та біологічної хімії, протокол № 12 від 30 травня 2025 р.

Відповідальний за впровадження:


Завідувач кафедри медичної та біологічної хімії,
д. мед. н., професор ЗВО



Андрій МЕЛЬНИК

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
та навчальної роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова

 д.мед.н., проф. Інна АНДРУШКО
"9" червня 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів та механізмах H₂S-залежної кардіопротекції.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Остренюк Роман Сергійович.

3. Джерела інформації:

1. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2022) Рівень гідроген сульфїду та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гама-ліаза. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(4), 550-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05_6](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05_6)
2. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфїду в серцево-судинній системі щурів. Медична та клінічна хімія, 3, 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>
3. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профіброгенних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 98(4), 35-41. <https://doi.org/10.25040/ecrb2023.04.035>

4. Де і коли впроваджено: кафедра патологічної фізіології, 2024-2025 н.р.

5. Результати впровадження: у науково-навчальний процес

Використання результатів наукових досліджень Остренюка Р. С. в навчальному процесі при проведенні практичних занять за темами «Патофізіологія серцево-судинної системи» та «Типові порушення обміну речовин» дозволяє розширити знання студентів про вплив кальцитріолу та модуляторів обміну H₂S на продукування ендогенного гідроген сульфїду, рівні прозапальних та профіброгенних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі за ожиріння.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри патологічної фізіології, протокол № 14 від 02. 06. 2025 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патологічної
фізіології, к. мед. н., доцент ЗВО



Вікторія ПИЛИПОНОВА



ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького

доц. Солонинко І. І.

“ 27 ” лютого 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфід у серцево-судинній системі щурів.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Остренюк Роман Сергійович.

3. Джерела інформації:

1. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2022) Рівень гідроген сульфід та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гама-ліаза. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(4), 550-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05_6](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05_6)
2. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфід у серцево-судинній системі щурів. Медична та клінічна хімія, 3, 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>
3. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфід на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профібrogenних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 98(4), 35-41. <https://doi.org/10.25040/ecpb2023.04.035>

4. Де і коли впроваджено: кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 2023-2024 н.р.

5. Результати впровадження: у науково-навчальний процес

Використання результатів наукових досліджень Остренюка Р.С. у навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти про роль активної форми вітаміну D (кальцитріолу) у регуляції обміну гідроген сульфід у серцево-судинній системі в нормі та за експериментального ожиріння.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної хімії, протокол №10 від 27 лютого 2024 р.

Відповідальний за впровадження: доц. Федевич Ю. М.

Завідувач кафедри біологічної хімії
ЛНМУ імені Данила Галицького
д.б.н., проф.

Леся КОБИЛІНСЬКА



“ 28 ” грудня 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфід у серцево-судинній системі щурів.
2. Ким і коли запропоновано: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Остренюк Роман Сергійович.
3. Джерело інформації (інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конгреси, конференції, семінари, тощо):
 1. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2022) Рівень гідроген сульфід та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гамма-ліаза. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(4), 550-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05_6](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05_6)
 2. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфід у серцево-судинній системі щурів. Медична та клінічна хімія, 3, 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>
 3. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфід на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профіброгенних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 98(4), 35-41. <https://doi.org/10.25040/ecrb2023.04.035>
4. Де і коли впроваджено: кафедра біологічної хімії Харківського національного медичного університету, 2023-2024 н.р.
5. Результати застосування методу за період з 2023 по 2024 р.р.: впроваджено у науково-навчальний процес, що надає здобувачам вищої освіти розширену теоретичну інформацію стосовно участі активної форми вітаміну D у регуляції функцій серцево-судинної системи за фізіологічних умов та за експериментального ожиріння, опосередкованої через вплив на систему гідроген сульфід.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3): Використання результатів наукових досліджень Остренюка Р.С. в навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти про роль активної форми вітаміну D (кальцитріолу) в регуляції обміну гідроген сульфід та асоційованих з ним процесів в серцево-судинній системі в нормі та за експериментального ожиріння.
7. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Відповідальний (і) за впровадження: _____

28. 12. 24
(дата)

Завідувач кафедри біологічної хімії,
д.мед.н., проф.

Оксана НАКОНЕЧНА

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи
Полтавського державного медичного університету

д.мед.н., проф. Валентин ДВОРНИК

2024 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфїду в серцево-судинній системі шурів.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Остренюк Роман Сергійович.

3. Джерела інформації:

1. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2022) Рівень гідроген сульфїду та морфологічні зміни в аорті шурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гама-ліаза. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(4), 550-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05) 6
2. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфїду в серцево-судинній системі шурів. Медична та клінічна хімія, 3, 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>
3. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профіброгенних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі шурів за експериментального ожиріння. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 98(4), 35-41. <https://doi.org/10.25040/ecpb2023.04.035>

4. Де і коли впроваджено: кафедра біологічної та біоорганічної хімії Полтавського державного медичного університету, 2023-2024 н.р.

5. Результати впровадження: у науково-навчальний процес

Використання результатів наукових досліджень Остренюка Р.С. в навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти про роль активної форми вітаміну D (кальцитріолу) в регуляції обміну гідроген сульфїду в серцево-судинній системі в нормі та за експериментального ожиріння.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної та біоорганічної хімії, протокол № 9 від 16.01. 2024 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біологічної та біоорганічної хімії, д. мед. н., проф.

Каріне НЕПОРАДА

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Біологія, д.б.н., проф. Людмила ОСТАПЧЕНКО

«19 лютого» 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: роль вітаміну D в регуляції метаболізму гідроген сульфід у серцево-судинній системі щурів.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра біохімії ім. професора О.О. Пентюка Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Остренюк Роман Сергійович.

3. Джерела інформації:

1. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2022) Рівень гідроген сульфід у та морфологічні зміни в аорті щурів під впливом вітаміну D в умовах модуляції системи H₂S / цистатіонін-гама-ліаза. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(4), 550-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26\(4\)-05_6](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2022-26(4)-05_6)
2. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив кальцитріолу на продукування гідроген сульфід у серцево-судинній системі щурів. Медична та клінічна хімія, 3, 5–12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i3.14002>
3. Остренюк, Р.С., & Заїчко, Н. В. (2023). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфід на експресію гена CSE, рівні прозапальних та профіброгенних медіаторів, морфологічні зміни в серцево-судинній системі щурів за експериментального ожиріння. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 98(4), 35-41. <https://doi.org/10.25040/ecpb2023.04.035>

4. Де і коли впроваджено: кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 2023-2024 н.р.

5. Результати впровадження: у науково-навчальний процес

Використання результатів наукових досліджень Остренюка Р.С. в навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти про роль активної форми вітаміну D (кальцитріолу) в регуляції обміну гідроген сульфід у серцево-судинній системі в нормі та за експериментального ожиріння.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біохімії, протокол №9 від 19 лютого 2024 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біохімії,
д.б.н., проф.



Олексій САВЧУК