

## ВПЛИВ КАЛЬЦИТРИОЛУ НА ПРОДУКУВАННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ СИСТЕМІ ЩУРІВ

**Вступ.** Порушення статусу вітаміну D є незалежним чинником високого кардіоваскулярного ризику, артеріальної гіпертензії, коронаросклерозу, інфаркту міокарда. Встановлено безпосередню участь активної форми вітаміну D (кальцитриолу) в регуляції проліферації, клітинної адгезії, мембранного транспорту в серцево-судинній системі. В окремих роботах засвідчено бустерний вплив вітаміну D на рівень поліфункціонального газового медіатора гідроген сульфід (H<sub>2</sub>S) у тканинах. Однак участі кальцитриолу в регуляції різних ланок обміну H<sub>2</sub>S у серці та судинах остаточно не з'ясовано, і вона потребує подальшого вивчення.

**Мета дослідження** – встановити вплив кальцитриолу на різні ланки обміну гідроген сульфід у аорті й міокарді щурів.

**Методи дослідження.** Досліди проведено на 105 білих лабораторних щурах-самцях з дотриманням принципів біоетики. Кальцитриол вводили внутрішньошлунково в дозах 0,1 та 1,0 мкг/кг маси тварини впродовж 4 тижнів. Контрольні щури отримували еквівалентну кількість розчинника. У гомогенатах аорти і міокарда визначали рівень H<sub>2</sub>S та активність ферментів його обміну. Експресію гена цистатіонін-γ-ліази (CSE) визначали методом кількісної полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального часу (qRT-PCR). Статистичну обробку результатів проводили в пакетах MS Excel та IBM Statistics SPSS 26 for Windows. Достовірність відмінностей оцінювали за U-критерієм Манна – Уїтні при рівні значущості p<0,05.

**Результати й обговорення.** Кальцитриол спричиняв різновекторні зміни обміну H<sub>2</sub>S у серцево-судинній системі залежно від дози і тривалості застосування. У дозі 0,1 мкг/кг він викликав збільшення рівня H<sub>2</sub>S в аорті й міокарді щурів, підвищення активності ферментів його синтезу та утилізації впродовж 4 тижнів дослідження, в дозі 1,0 мкг/кг – зростання рівня H<sub>2</sub>S в аорті й міокарді тварин протягом перших 14 діб, але в подальшому справляв депримуєчий ефект на ферменти обміну H<sub>2</sub>S і зумовлював зниження його рівня в аорті й міокарді щурів. Кальцитриол впливав на експресію гена CSE в аорті й міокарді щурів із стимулювальним ефектом у дозі 0,1 мкг/кг та інгібуєчим ефектом у дозі 1,0 мкг/кг.

**Висновки.** Кальцитриол є регулятором активності різних ланок обміну H<sub>2</sub>S у серцево-судинній системі щурів: у високих дозах він суттєво пригнічує активність H<sub>2</sub>S-синтезуювальних ферментів та ферментів утилізації H<sub>2</sub>S в аорті й міокарді, а у фізіологічних концентраціях, навпаки, стимулює його продукування. Феномен впливу кальцитриолу на систему H<sub>2</sub>S є важливим для вибору стратегії профілактики захворювань серцево-судинної системи при різному статусі вітаміну D<sub>3</sub>.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гідроген сульфід; метаболізм; вітамін D; кальцитриол; аорта; міокард; щури.

ВСТУП. Порушення статусу вітаміну D є доведеним незалежним чинником високого кардіоваскулярного ризику, артеріальної гіпертензії, коронаросклерозу, інфаркту міокарда [1, 2]. Рецептори вітаміну D (VDR) експресуються в кардіоміоцитах, фібробластах, судинному ендотелії [1, 3], що свідчить про пряму участь його активної форми – кальцитриолу (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) в регуляції процесів проліферації, клітинної адгезії, мембранного транспорту тощо в серцево-судинній системі. Також у міокарді експресується 1α-гідроксилаза, що вказує на можливість активації проміжного метаболіту вітаміну D – 25(OH)D<sub>3</sub> до 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> безпосередньо у сер-

© Р. С. Остренюк, Н. В. Заїчко, 2023.

цево-судинній системі [3]. Експериментально доведено, що через рецептори VDR вітамін D безпосередньо впливає на систему вазоконстрикторів і вазодилаторів: нокаут гена VDR викликає активацію ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) [4] та інгібування системи ендотеліального нітроген монооксиду (eNOS/NO) в мишей [5].

У регуляції судинного тонуусу і функціонального стану міокарда важливу роль відіграє поліфункціональний газовий медіатор – гідроген сульфід (H<sub>2</sub>S) [6, 7]. У серці та судинах він переважно синтезується з L-цистеїну з участю цистатіонін-γ-ліази і 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (разом із цистеїнамінотрансферазою)

[6, 7]. Також ендogenous  $H_2S$  може утворюватися з тіосульфат-аніона спонтанно та з участю тіосульфатсульфуртрансфераз за наявності кофакторів – відновленого глутатіону, тіоредоксину, дигідроліпоєвої кислоти [6–8]. Депонування та утилізацію  $H_2S$  забезпечують мітохондріальні системи оксидоредуктази і цитозольні метилтрансферази [6, 7]. В окремих дослідженнях засвідчено можливу участь вітаміну D у регуляції обміну  $H_2S$ . Так, В. Wiliński та ін. уперше показали, що введення вітаміну  $D_3$  підвищує концентрацію  $H_2S$  у міокарді здорових щурів [9]. Р. Маппа та ін. виявили здатність кальцитріолу збільшувати активність цистатіонін-γ-ліази в культурі адипоцитів *in vitro* [10]. Однак загалом вплив кальцитріолу на різні складові системи  $H_2S$  у серці та судинах залишається маловідомим і потребує окремих досліджень.

Мета дослідження – встановити вплив кальцитріолу на різні ланки обміну гідроген сульфід у аорті й міокарді щурів.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди виконано на 105 білих статевозрілих лабораторних щурах-самцях із початковою масою 160–190 г. Усі етапи дослідження проведено з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, затверджених у резолюціях I–VII національних конгресів України з біоетики (Київ, 2001–2019), міжнародних вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Директив Ради Європи 86/609/ЄЕС (1986), Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 21.02.2006 р. № 3447-IV (ст. 26).

Тварини перебували в стандартних умовах експериментальної біологічної клініки Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова: за 12-годинного світлового режиму день/ніч, температури 20–24 °C, відносної вологості повітря 50–60 %, з вільним доступом до води та їжі (стандартного повнораціонного гранульованого корму для лабораторних гризунів ТОВ “НВП Ф.У.Д.”, Україна). Розподіл щурів на дослідні групи здійснювали випадковим чином, за принципом мінімізації відмінностей за масо-ростовими параметрами. Кальцитріол (Calcitriolo Teva, Teva Italia S.r.l.) вводили внутрішньошлунково в дозах 0,1 та 1,0 мг/кг маси тварини у вигляді масляної суспензії (на рафінованій кукурудзяній олії) 1 раз на 2 доби впродовж 4 тижнів. Дози  $1,25(OH)_2D_3$  було взято з літератури, і вони не викликали загибелі щурів [11]. Контрольні тварини отримували еквівалентну кількість олії (0,1 мл на 100 г маси щура). Евтаназію тварин проводили шляхом декапітації під

тіопенталовим наркозом (100 мг/кг інтраперитонеально).

У тварин вилучали серце та грудну аорту, промивали охолодженим розчином 1,15 % KCl, відбирали наважки тканин, подрібнювали ножицями, гомогенізували впродовж 2 хв в охолодженому середовищі 1,15 % KCl у співвідношенні маса/об’єм 1:4 при 3000 об./хв (тефлон-скло). Центрифугували 30 хв при 600 g і температурі 4 °C, відбирали аліквоти пост’ядерного супернатанта в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20 °C. Активність  $H_2S$ -синтезувальних ензимів – цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистеїнамінотрансферази (ЦАТ, КФ 2.6.1.3) разом із 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою (3-МСТ, КФ 2.8.1.2), тіосульфатсульфуртрансферази (ТСТ) визначали за швидкістю утворення сульфід-аніона, активність сульфітоксидази (КФ 1.8.3.1) – за швидкістю відновлення гексоціаноферату калію за наявності сульфід-аніона, активність тіоредоксинредуктази (КФ 1.8.1.9) – за швидкістю NADPH-залежного відновлення 5,5'-дитіобіс(2-нітробензоату), як зазначено раніше [12]. Вміст гідроген сульфід у пост’ядерному супернатанті гомогенатів аорти і серця визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном за наявності  $FeCl_3$  [9].

Рівень експресії гена цистатіонін-γ-ліази (CSE) визначали методом кількісної полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального часу (qRT-PCR) [13]. Загальну РНК виділяли за допомогою комплекту реагентів “Quick-RNA Micro-Prep Kit” (“Zymo Research”, США); кДНК отримували, застосовуючи набір “ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit” (“New England BioLabs”, США). Експресію гена CSE визначали за наявності барвника SYBR Green I на ампліфікаторі CFX 96 (“Bio Rad”, США). Для проведення реакції було використано такі пари праймерів:

CSE – F (прямий):

5'-GCTGAGAGCCTGGGAGGATA-3';

R (зворотний):

5'-TCACTGATCCCGAGGGTAGCT-3';

Actb – F (прямий):

5'-ACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3';

R (зворотний):

5'-TATCGTCATCCATGGCGAACT-3'.

Режим ампліфікації: 94 °C, 3 хв (преденатурація); 40 циклів: 94 °C – 15 с (денатурація); 64 °C – 40 с (відпал); 72 °C – 30 с (елонгація). Для контролю специфічності реакції димеризації праймерів у кінці кожного циклу ампліфікації реєстрували флуоресценцію неспецифічного інтеркалюючого барвника SYBR-Green з побудовою кривої плавлення. Кількість мРНК цільо-

вого гена визначали за допомогою відносного методу Ct ( $\Delta\Delta Ct$  Method) з розрахунком за формулою  $2^{-\Delta Ct}$ . Результати нормалізували до мРНК референтного гена  $\beta$ -актину; відносний рівень мРНК CSE/Actb виражали в умовних одиницях. Статистичну обробку результатів проводили в пакетах MS Excel та IBM Statistics SPSS 26 for Windows. Достовірність відмінностей оцінювали за U-критерієм Манна – Уїтні. Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ . Результати наведено як  $M \pm m$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Встановлено, що введення кальцитріолу викликало зміни обміну  $H_2S$  в аорті й міокарді щурів, але спрямованість та виразність ефекту залежали від дози гормону і тривалості його застосування. Так, у щурів, які отримували  $1,25 (OH)_2D_3$  у дозі  $0,1$  мкг/кг, станом на 14-ту добу спостерігали помірне підвищення рівня  $H_2S$  в аорті ( $2,29 \pm 0,14$ ) проти ( $1,93 \pm 0,09$ ) нмоль/мг протеїну в групі контролю,  $p < 0,05$ , тоді як у міокарді цей показник практично не змінився (рис. 1). Станом на 28-му добу введення  $1,25 (OH)_2D_3$  у дозі  $0,1$  мкг/кг забезпечило статистично значуще збільшення вмісту  $H_2S$  як в аорті, так і в міокарді порівняно з групою контролю (на  $52,8$  та  $37,1$  %,  $p < 0,01$ ) і станом на 14-ту добу (на  $28,8$  та  $30,2$  %,  $p < 0,05$ ) відповідно. Станом на 14-ту добу введення  $1,25 (OH)_2D_3$  у дозі  $1,0$  мкг/кг спричинило статис-

тично значуще зростання рівня  $H_2S$  в аорті й міокарді (на  $60,2$  та  $28,6$  % порівняно з групою контролю,  $p < 0,05$ ). Проте станом на 28-му добу в цій групі зареєстрували зниження рівня  $H_2S$  в аорті й міокарді: на  $35,3$  та  $22,7$  % відносно групи контролю ( $p < 0,05$ ) і на  $59,6$  та  $39,8$  % ( $p < 0,05$ ) щодо стану на 14-ту добу.

Таким чином, кальцитріол у терапевтичному діапазоні концентрацій забезпечував стійке помірне збільшення вмісту  $H_2S$  в аорті щурів на 14-ту добу, і цей ефект посилювався на 28-му добу. В міокарді достовірно підвищення рівня  $H_2S$  за дії кальцитріолу в дозі  $0,1$  мкг/кг спостерігали лише на 28-му добу. Двотижневе застосування високої дози кальцитріолу індукувало зростання рівня  $H_2S$  як в аорті, так і в міокарді, однак подальше застосування викликало формування дефіциту  $H_2S$  у серцево-судинній системі щурів.

Різновекторність впливу високих та низьких доз кальцитріолу на рівень  $H_2S$  у серцево-судинній системі щурів спонукала провести комплексне дослідження активності ключових ензимів обміну цього газотрансміттера станом на 28-му добу. Встановлено, що введення кальцитріолу в дозі  $0,1$  мкг/кг спричинило статистично значуще підвищення активності ензимів, які забезпечують утворення  $H_2S$  із L-цистеїну в серцево-судинній системі (табл.). Так, у групі “ $1,25 (OH)_2D_3$   $0,1$  мкг/кг” активність ЦГЛ і ЦАТ/3-МСТ в аорті

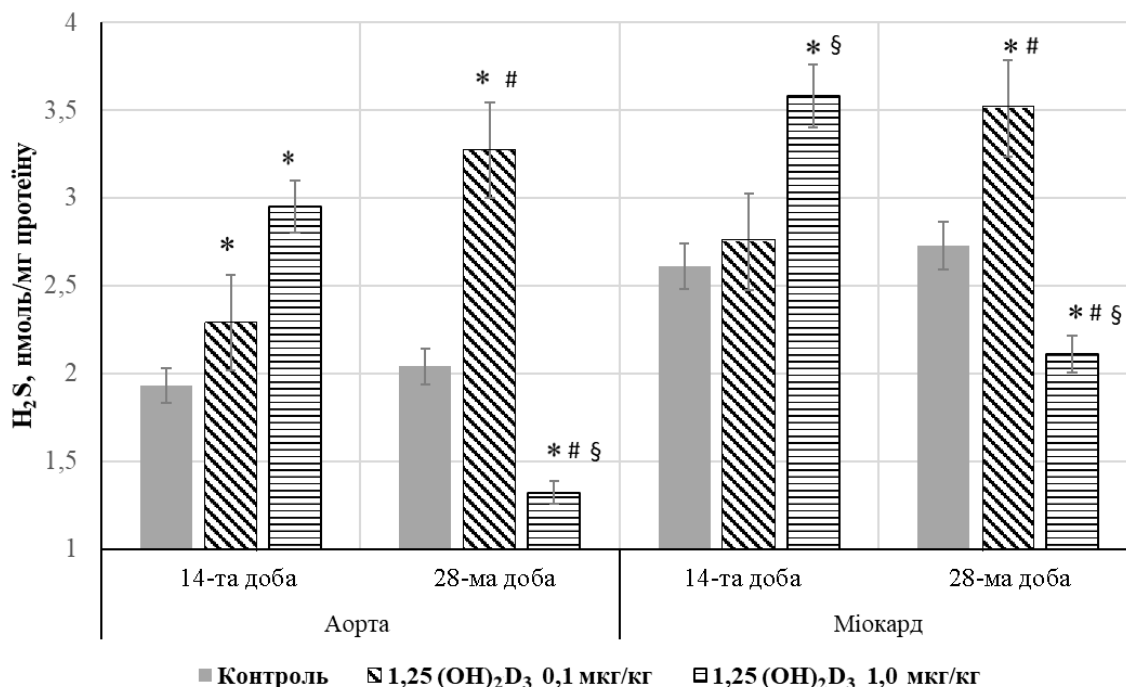


Рис. 1. Вплив кальцитріолу на рівень  $H_2S$  в аорті й міокарді щурів ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Примітки:

1. \*  $p < 0,05$  – відносно групи контролю.
2. #  $p < 0,05$  – відносно стану на 14-ту добу у відповідній групі.
3. §  $p < 0,05$  – відносно групи “ $1,25 (OH)_2D_3$   $0,1$  мкг/кг”.

була вищою на 43,9 та 44,4 % порівняно з групою контролю, тоді як у міокарді – на 38,1 і 29,3 % відповідно. Також кальцитріол у дозі 0,1 мкг/кг викликав зростання активності тіосульфато залежного утворення H<sub>2</sub>S: станом на 28-му добу активність ТСТ в аорті й міокарді була вищою на 29,3 та 37,5 %, ніж у групі контролю. Під час дослідження активності мітохондріальних ензимів шляху утилізації H<sub>2</sub>S – сульфітоксидази та тіоредоксинредуктази не було виявлено статистично значущих змін в аорті й міокарді при введенні кальцитріолу в дозі 0,1 мкг/кг.

Встановлено, що кальцитріол у дозі 1,0 мкг/кг справляв депримуєчий ефект на всі досліджувані ензими обміну H<sub>2</sub>S, за винятком шляху ЦАТ/3-МСТ. Зокрема, станом на 28-му добу в групі “1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 1,0 мкг/кг” активність ЦГЛ, ТСТ, сульфітоксидази і тіоредоксинредуктази в аорті була нижчою на 33,6; 25,7; 24,6; 22,3 %, а в міокарді – на 30,2; 28,1; 19,4; 24,9 % відповідно порівняно з групою контролю. Кальцитріол у дозі 1,0 мкг/кг справляв помірний стимулювальний ефект на продукування H<sub>2</sub>S із L-цистеїну з участю ЦАТ/3-МСТ в аорті й міокарді, яке було

вищим на 33,3 та 25,6 % (p<0,05) порівняно з групою контролю і зіставним з таким у групі “1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 0,1 мкг/кг”.

Оцінка рівня експресії гена CSE в серцево-судинній системі щурів підтвердила відмінності впливу високих та низьких доз кальцитріолу на обмін H<sub>2</sub>S (рис. 2). Станом на 28-му добу в групі “1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 0,1 мкг/кг” відносний рівень мРНК CSE/Actb в аорті й міокарді був вищим на 38,8 та 34,2 % (p<0,01), а в групі “1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 1,0 мкг/кг”, навпаки, нижчим на 32,6 і 37,2 % (p<0,01) порівняно з групою контролю, що узгоджується зі змінами десульфуразної активності ЦГЛ. Отже, кальцитріол є безпосереднім регулятором продукування H<sub>2</sub>S на рівні експресії гена CSE в аорті й міокарді щурів із стимулювальним ефектом у терапевтичній дозі та інгібуючим ефектом у високій дозі.

Незважаючи на те, що позакісткові ефекти вітаміну D<sub>3</sub> активно досліджують в останні роки, ролі кальцитріолу в регуляції обміну H<sub>2</sub>S остаточно не з'ясовано. Уперше вплив вітаміну D<sub>3</sub> на концентрацію H<sub>2</sub>S у тканинах тварин було описано в роботі В. Wiliński та ін. [9]. Засвідчено,

Таблиця – Вплив кальцитріолу на активність H<sub>2</sub>S-синтезувальних ензимів в аорті й міокарді щурів (M±m, n=10)

Активність ензимів, нмоль/хв на 1 мг протеїну		Група щурів			p-value
		контроль 1	1,25 (ОН) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> 0,1 мкг/кг 2	1,25 (ОН) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> 1,0 мкг/кг 3	
ЦГЛ	Аорта	1,07±0,10	1,54±0,14	0,71±0,02	p <sub>1,2</sub> <0,05 p <sub>1,3</sub> <0,01 p <sub>2,3</sub> <0,001
	Міокард	0,76±0,06	1,05±0,10	0,53±0,07	p <sub>1,2</sub> <0,05 p <sub>1,3</sub> <0,05 p <sub>2,3</sub> <0,01
ЦАТ/3-МСТ	Аорта	0,54±0,06	0,78±0,10	0,72±0,07	p <sub>1,2</sub> <0,05 p <sub>1,3</sub> <0,05 p <sub>2,3</sub> >0,05
	Міокард	1,09±0,07	1,41±0,12	1,37±0,09	p <sub>1,2</sub> <0,05 p <sub>1,3</sub> <0,05 p <sub>2,3</sub> >0,05
ТСТ	Аорта	1,67±0,13	2,16±0,16	1,24±0,15	p <sub>1,2</sub> <0,05 p <sub>1,3</sub> <0,05 p <sub>2,3</sub> <0,01
	Міокард	1,28±0,10	1,76±0,49	0,92±0,12	p <sub>1,2</sub> <0,05 p <sub>1,3</sub> <0,05 p <sub>2,3</sub> <0,01
Сульфіт-оксидаза	Аорта	3,49±0,16	3,73±0,28	2,63±0,09	p <sub>1,2</sub> >0,05 p <sub>1,3</sub> <0,01 p <sub>2,3</sub> <0,01
	Міокард	4,16±0,18	4,35±0,27	3,35±0,09	p <sub>1,2</sub> >0,05 p <sub>1,3</sub> <0,01 p <sub>2,3</sub> <0,01
Тіоредоксин-редуктаза	Аорта	2,15±0,13	2,36±0,12	1,67±0,15	p <sub>1,2</sub> >0,05 p <sub>1,3</sub> <0,05 p <sub>2,3</sub> <0,01
	Міокард	4,37±0,21	4,91±0,37	3,28±0,22	p <sub>1,2</sub> >0,05 p <sub>1,3</sub> <0,01 p <sub>2,3</sub> <0,01

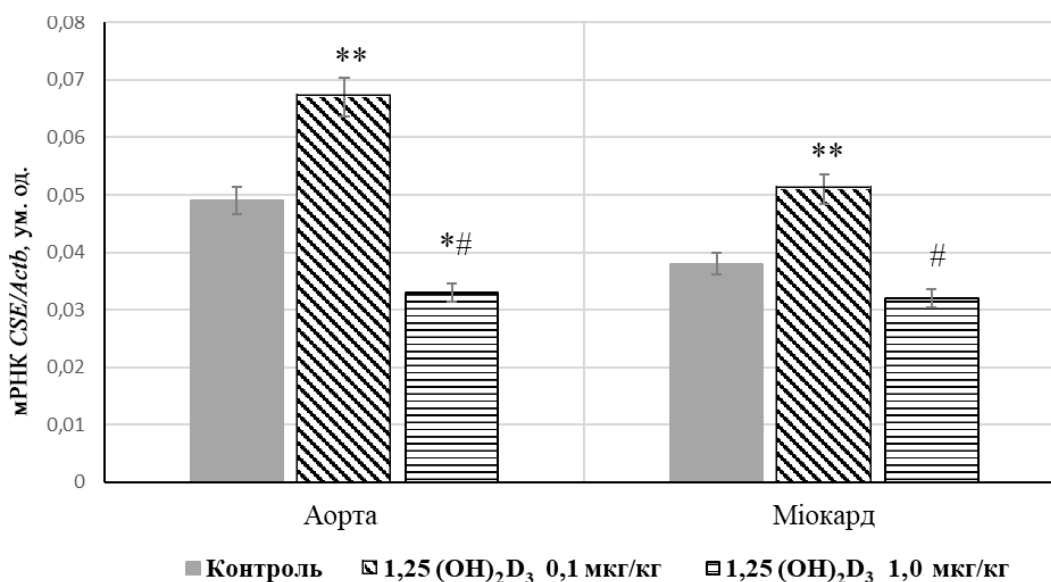


Рис. 2. Вплив кальцитріолу на експресію гена CSE в аорті й міокарді щурів ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Примітки:

1. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  – відносно групи контролю.
2. #  $p < 0,01$  – відносно групи “1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 0,1 мкг/кг”.

що введення вітаміну D<sub>3</sub> у дозах 10 000 МО і 40 000 МО інтраперитонеально впродовж 5 днів викликало підвищення рівня H<sub>2</sub>S в органах здорових мишей, при цьому найбільший бустерний ефект зареєстровано в серці, менш виразний – у мозку та нирках [9]. Показано, що кальцитріол у концентраціях 25 і 50 нмоль підвищував активність ЦГЛ та формування H<sub>2</sub>S у культурі адипоцитів, передінкубованих із глюкозою [10]. Кальцитріол стимулював продукування H<sub>2</sub>S у культурі шванівських клітин щурів, що запобігло нейротоксичному ефекту високого рівня глюкози і метилглюксалу [14]. Також у культурі ізольованих кардіоміоцитів кальцитріол (0,4 й 1,0 мкг/мл) зменшував ознаки мітохондріальної дисфункції та оксидативного стресу, ініційованих алюміній фосфідом [15]. Активність ЦГЛ може регулюватися внутрішньоклітинним рівнем кальцію, і цей ефект не опосередковується через кальмодулін, але певною мірою залежить від піридоксальфосфату [16]. Так, за наявності піридоксальфосфату ЦГЛ-залежне продукування H<sub>2</sub>S стимулюється низьким рівнем Ca<sup>2+</sup> і гальмується високим рівнем Ca<sup>2+</sup>. За відсутності піридоксальфосфату H<sub>2</sub>S-синтезувальна активність ЦГЛ пригнічується високим рівнем Ca<sup>2+</sup> і ще більше зменшується за низьких концентрацій Ca<sup>2+</sup> [16]. Молекулярний механізм цього явища залишається невизначеним. Також потребують уточнення механізми впливу кальцитріолу на експресію ЦГЛ у серцево-судинній системі. Потенційно цей ефект може бути пов'язаний з участю вітаміну D у регуляції активності гістондеацетилаз та ДНК-метилтрансфераз [17].

Існують дані, що інгібітори активності гістондеацетилази 6 (HDAC6) підвищують експресію ЦГЛ у культурі ендотеліальних клітин людини [18], кальцитріол, у свою чергу, пригнічує експресію гістондеацетилаз [17].

Інформація щодо ролі кальцитріолу в регуляції активності інших ензимів, причетних до обміну H<sub>2</sub>S, залишається дуже обмеженою. Y. Mikami та ін. встановили, що продукування H<sub>2</sub>S у шляху ЦАТ/3-МСТ може регулюватись рівнем кальцію, при цьому в разі значного зростання рівня Ca<sup>2+</sup> активність ЦАТ зменшується, а активність 3-МСТ не змінюється [19]. Кальцитріол впливає на систему тіоредоксину через стимуляцію експресії протеїну TXNIP – інактиватора тіоредоксину, що може спричиняти посилення оксидативного стресу в культурах різних пухлинних клітин *in vitro* [20, 21]. За іншими даними, кальцитріол стимулює експресію тіоредоксинредуктази в культурі моноцитів, але цей ефект спостерігають лише за наявності селеніту [22].

Таким чином, кальцитріол є регулятором активності різних ланок обміну H<sub>2</sub>S у серцево-судинній системі щурів, при цьому найбільш чутливою мішенню слід вважати ЦГЛ. У високих дозах кальцитріол суттєво пригнічує активність H<sub>2</sub>S-синтезувальних ензимів та ензимів утилізації H<sub>2</sub>S в аорті й міокарді, а у фізіологічних концентраціях, навпаки, стимулює його продукування. Феномен впливу кальцитріолу на систему H<sub>2</sub>S є важливим для вибору стратегії профілактики захворювань серцево-судинної системи при різному статусі вітаміну D<sub>3</sub> і перспективним напрямком для подальшого вивчення.

ВИСНОВКИ. 1. Активна форма вітаміну D<sub>3</sub> (1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) спричиняє різновекторні зміни обміну H<sub>2</sub>S в аорті й міокарді щурів залежно від дози і тривалості застосування. У дозі 0,1 мкг/кг кальцитриол викликає стійке збільшення рівня H<sub>2</sub>S в аорті й міокарді щурів упродовж 4 тижнів досліду, що супроводжується підвищенням активності ферментів синтезу (ЦГЛ, ТСТ, ЦАТ/3-МСТ) та утилізації H<sub>2</sub>S (тіоредоксинредуктази, сульфіт-оксидази), в дозі 1,0 мкг/кг – зростання рівня H<sub>2</sub>S в аорті й міокарді тварин протягом перших 14 діб, але в подальшому справляє депримуєчий ефект

на ферменти синтезу та утилізації H<sub>2</sub>S (за винятком ЦАТ/3-МСТ) і зумовлює формування дефіциту H<sub>2</sub>S у серцево-судинній системі щурів.

2. Серед усіх досліджуваних показників обміну H<sub>2</sub>S найбільші зміни під впливом 1,25 (ОН)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> у дозах 0,1 та 1,0 мкг/кг стосувались активності ЦГЛ в аорті й міокарді щурів. Встановлено, що кальцитриол безпосередньо регулює продукування H<sub>2</sub>S у серцево-судинній системі тварин на рівні експресії гена CSE із стимулювальним ефектом у дозі 0,1 мкг/кг та інгібуючим ефектом у дозі 1,0 мкг/кг.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Latic N., Erben R.G. Vitamin D and cardiovascular disease, with emphasis on hypertension, atherosclerosis, and heart failure / N. Latic, R. G. Erben // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – **21**, Issue 18. – P.6483. DOI: 10.3390/ijms21186483.
- The effects of vitamin D supplementation and 25-hydroxyvitamin D levels on the risk of myocardial infarction and mortality / P. Acharya, T. Dalia, S. Ranka [et al.] // *Journal of the Endocrine Society.* – 2021. – **5**, Issue 10. – bvab124. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab124>
- Expression of the vitamin D receptor is increased in the hypertrophic heart / S. Chen, D. J. Glenn, W. Ni [et al.] // *Hypertension.* – 2008. – **52**. – P.1106–1112. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119602.
- 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system / Y. C. Li, J. Kong, M. Wei [et al.] // *J. Clin. Investig.* – 2002. – **110**. – P. 229–238. DOI: 10.1172/JCI0215219.
- Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice / O. Andrukhova, S. Slavic, U. Zeitz [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2014. – **28**. – P. 53–64. DOI: 10.1210/me.2013-1252.
- Hydrogen sulfide and vascular regulation – An update / B. Lv, S. Chen, C. Tang [et al.] // *J. Adv. Res.* – 2021. – **27**. – P. 85–97. DOI: 10.1016/j.jare.2020.05.007.
- Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease / G. K. Kolluru, R. E. Shackelford, X. Shen [et al.] // *Nat. Rev. Cardiol.* – 2023. – **20**. – P. 109–125. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6>
- Thiosulfate sulfurtransferase-like domain-containing 1 protein interacts with thioredoxin / M. Libiad, N. Motl, D. L. Akey [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2018. – **293**, Issue 8. – P. 2675–2686. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000826>
- Vitamin D3 (cholecalciferol) boosts hydrogen sulfide tissue concentrations in heart and other mouse organs / B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi [et al.] // *Folia Biol (Krakow).* – 2012. – **60**, Issue 3–4. – P. 243–247. DOI: 10.3409/fb60\_3-4.243-247.
- Manna P. Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine-γ-lyase (CSE) activation and H<sub>2</sub>S formation in 3T3L1 adipocytes / P. Manna, S. K. Jain // *J Biol Chem.* – 2012. – **287**, Issue 50. – P. 42324–42332. DOI: 10.1074/jbc.M112.407833.
- Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism / Y. Yin, Z. Yu, M. Xia [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2012. – **42**, Issue 11. – P.1189–1196. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x.
- Блажченко В. В. Вплив цинк сульфату, тіосульфату натрію, ліпоевої кислоти та таурину на обмін гідроген сульфід у нирках щурів з дієтіндукованим ожирінням / В. В. Блажченко, Н. В. Заїчко // *Мед. та клініч. хімія.* – 2022. – **24**, № 1 (91). – С. 46–52.
- Hydrogen sulfide inhibits high-salt diet-induced myocardial oxidative stress and myocardial hypertrophy in Dahl rats / P. Huang, Z. Shen, W. Yu [et al.] // *Frontiers in pharmacology.* – 2017. – **8**. – P. 128. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00128>
- Calcitriol prevents peripheral RSC96 Schwann neural cells from high glucose & methylglyoxal-induced injury through restoration of CBS/H2S expression / H. Zhang, X. D. Zhuang, F. H. Meng [et al.] // *Neurochem. Int.* – 2016. – **92**. – P. 49–57. DOI: 10.1016/j.neuint.2015.12.005
- Calcitriol attenuates the cytotoxicity induced by aluminium phosphide via inhibiting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rat isolated cardiomyocytes / A. A. Hafez, S. Samiei, A. Salimi [et al.] // *Pestic Biochem Physiol.* – 2021. – **176**. – P.104883. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104883.
- Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ-lyase at the steady-state low intracellular Ca(2+) concentrations / Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Ogasawara, H. Kimura // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – **431**. – P. 131–135. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.010.
- Calcitriol induces estrogen receptor α expression through direct transcriptional regulation and epigenetic modifications in estrogen receptor-negative breast cancer cells / N. Santos-Martínez, L. Díaz, V. M. Ortiz-Ortega [et al.] // *Am. J. Cancer Res.* – 2021. – **11**, Issue 12. – P. 5951–5964.
- Cystathionine γ-lyase protects vascular endothelium: a role for inhibition of histone deacetylase 6 / T. M. Leucker, Y. Nomura, J. H. Kim [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2017. – **312**, Issue 4. – P.711–720. DOI: 10.1152/ajpheart.00724.2016.
- Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca<sup>2+</sup> influx / Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura [et al.] // *J Biol. Chem.* –

2011. – **286**, Issue 45. – P. 39379–39386. DOI: 10.1074/jbc.M111.298208.

20. Effects of vitamin D3 stimulation of thioredoxin-interacting protein in hepatocellular carcinoma / J. P. Hamilton, J. J. Potter, L. Koganti [et al.] // *Hepatol. Res.* – 2014. – **44**, Issue 13. – P. 1357–1366. DOI: 10.1111/hepr.12302.

21. Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) mediates thioredoxin-dependent antioxidant mechanism in endometrial cancer cells treated with 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin

D<sub>3</sub> / Y. Kim, Y.-S. Kim, M. Kim [et al.] // *Anticancer Research Sep.* – 2019. – **39**, Issue 9. – P. 4795–4803. DOI: 10.21873/anticancerres.13664

22. The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells--regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and selenite / N. Schütze, J. Fritsche, R. Ebert-Dümmig [et al.] // *Biofactors.* – 1999. – **10**, Issue 4. – P. 329–338. DOI: 10.1002/biof.5520100403.

## REFERENCES

1. Latic, N., & Erben, R.G. (2020). Vitamin D and cardiovascular disease, with emphasis on hypertension, atherosclerosis, and heart failure. *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (18), 6483. DOI: 10.3390/ijms21186483.

2. Acharya, P., Tarun, D., Ranka, S., Sethi, P., Oni, O.A., Safarova, M.S. ... & 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/jeendo/bvab124>

3. Chen, S., Glenn, D.J., Ni, W., Grigsby, C.L., Olsen, K., Nishimoto, M., ... & Gardner, D.G. (2008) Expression of the vitamin D receptor is increased in the hypertrophic heart. *Hypertension*, 52, 1106-1112. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119602.

4. Li, Y.C., Kong, J., Wei, M., Chen, Z.F., Liu, S.Q., & Cao, L.P. (2002) 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.*, 110, 229-238. DOI: 10.1172/JCI0215219.

5. Andrukhova, O., Slavic, S., Zeitz, U., Riesen, S.C., Heppelmann, M.S., Ambrisko, T.D. ... & Erben, R.G. (2014) Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol. Endocrinol.*, 28, 53-64. DOI: 10.1210/me.2013-1252.

6. Lv, B., Chen, S., Tang, C., Jin, H., Du, J., & Huang, Y. (2021) Hydrogen sulfide and vascular regulation—An update. *J. Adv. Res.*, 27, 85-97. DOI: 10.1016/j.jare.2020.05.007.

7. Kolluru, G.K., Shackelford, R.E., Shen, X., Paari, D. & Kevil, C.G. (2023) Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.*, 20, 109-125. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6>

8. 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. *J. Biol. Chem.*, 293 (8), 2675-2686. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000826>

9. 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 Biol. (Krakow)*, 60 (3-4), 243-247. DOI: 10.3409/fb60\_3-4.243-247.

10. Manna, P., & Jain, S.K. (2012). Vitamin D up-regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation and glucose utilization mediated by cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) activation and H<sub>2</sub>S formation in 3T3L1 adipocytes.

*J. Biol. Chem.*, 287 (50), 42324-42332. DOI: 10.1074/jbc.M112.407833.

11. 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. *Eur. J. Clin. Invest.*, 42 (11), 1189-1196. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x.

12. Blazhchenko, V.V., & Zaichko, N.V. (2022). The effect of zinc sulfate, sodium thiosulfate, lipoic acid, and taurine on hydrogen sulfide metabolism in kidneys of rats with diet-induced obesity. *Medical and Clinical Chemistry*, 24 (1), 46–52. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2022.i1.13036> [in Ukrainian]

13. 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>

14. Zhang, H., Zhuang, X.D., Meng, F.H., Chen, L., Dong, X.B., Liu, G.H., ... & Yang, C.T. (2016) Calcitriol prevents peripheral RSC96 Schwann neural cells from high glucose & methylglyoxal-induced injury through restoration of CBS/H2S expression. *Neurochem Int.*, 92, 49-57. DOI: 10.1016/j.neuint.2015.12.005

15. 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. *Pestic Biochem Physiol.*, 176, 104883. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104883.

16. Mikami, Y., Shibuya, N., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2013) Hydrogen sulfide is produced by cystathionine  $\gamma$ -lyase at the steady-state low intracellular Ca(2+) concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431, 131-135. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.010.

17. Santos-Martínez, N., Díaz, L., Ortiz-Ortega, V.M., Ordaz-Rosado, D., Prado-García, H., Avila, E., ... & García-Becerra, R. (2021) Calcitriol induces estrogen receptor  $\alpha$  expression through direct transcriptional regulation and epigenetic modifications in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Am. J. Cancer Res.*, 11 (12), 5951-5964.

18. Leucker, T.M., Nomura, Y., Kim, J.H., Bhatta, A., Wang, V., Wecker, A., ... & Pandey, D. (2017) Cystathionine  $\gamma$ -lyase protects vascular endothelium: a role for inhibition of histone deacetylase 6. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 312(4), 711-720. DOI: 10.1152/ajpheart.00724.2016.

19. 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 Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Biol. Chem.*, 286 (45), 39379-39386. DOI: 10.1074/jbc.M111.298208.

20. 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. *Hepato Res.*, 44 (13), 1357-1366. DOI: 10.1111/hepr.12302.

21. Kim, Y., Kim, Y.-S., Kim, M., Kim, J.-M., Lee, H.-H., & Kim, T.-H. (2019) Thioredoxin-interacting protein (TX-

NIP) mediates thioredoxin-dependent antioxidant mechanism in endometrial cancer cells treated with 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Anticancer Research.*, 39 (9) 4795-4803. DOI: 10.21873/anticancer.13664

22. Schütze, N., Fritsche, J., Ebert-Dümig, R., Schneider, D., Köhrle, J., Andreesen, R., ... & Jakob, F. (1999) The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells--regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and selenite. *Biofactors.*, 10 (4), 329-338. DOI: 10.1002/biof.5520100403.

Отримано 31.07.2023

Адреса для листування: Р. С. Остренюк, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна, e-mail: ostrenyuk.r@gmail.com.

R. S. Ostrenyuk, N. V. Zaichko

M. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## THE INFLUENCE OF CALCITRIOL ON THE PRODUCTION OF HYDROGEN SULFIDE IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF RATS

### Summary

**Introduction.** Vitamin D status disturbances are independent factor of high cardiovascular risk, arterial hypertension, coronary sclerosis, myocardial infarction. The active form of vitamin D (calcitriol) has been shown to be directly involved in the regulation of proliferation, cell adhesion, and membrane transport in the cardiovascular system. Some studies have demonstrated the booster effect of vitamin D on the level of the multifunctional gas mediator hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in tissues. However, the involvement of calcitriol in the regulation of various H<sub>2</sub>S metabolism pathways in the heart and blood vessels has not been definitively clarified and requires further investigation.

**The aim of study** – to determine the effect of calcitriol on different H<sub>2</sub>S metabolism pathways in the myocardium and aorta of rats.

**Research Methods.** The experiments were performed on 105 white male laboratory rats in accordance with the principles of bioethics. Calcitriol (1.25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) was administered intragastrically in doses of 0.1  $\mu$ g/kg and 1.0  $\mu$ g/kg of rat body weight for 4 weeks. Control rats received equivolume amounts of the solvent. In the aorta and myocardium homogenates were determined H<sub>2</sub>S level and the activity of H<sub>2</sub>S metabolism enzymes. The expression of the cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) gene was determined using the method of quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Statistical analysis of the results was performed using MS Excel and IBM Statistics SPSS 26 for Windows. The significance of the differences was assessed by the Mann-Whitney U test at a significance level of p<0.05.

**Results and Discussion.** Calcitriol induced multi-vector changes in H<sub>2</sub>S metabolism in the cardiovascular system depending on the dose and duration of use. 1.25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in a dose of 0.1  $\mu$ g/kg caused an increase in the level of H<sub>2</sub>S in the aorta and myocardium of rats and elevated the activity of enzymes of synthesis and utilization of H<sub>2</sub>S during the 4 weeks of the experiment. 1.25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> at a dose of 1  $\mu$ g/kg caused an increase in the level of H<sub>2</sub>S in the aorta and myocardium during the first 14 days, but subsequently had a depressing effect on the enzymes of H<sub>2</sub>S metabolism and caused a decrease in the level of H<sub>2</sub>S in rat myocardium and aorta. 1.25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> had an effect on CSE gene expression in the aorta and myocardium of rats with a stimulating effect at a dose of 0.1  $\mu$ g/kg and an inhibitory effect at a dose of 1  $\mu$ g/kg.

**Conclusions.** Calcitriol acts as a regulator of different H<sub>2</sub>S metabolism pathways in the cardiovascular system of rats: in high doses, 1.25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> significantly inhibits the activity of H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes and enzymes of H<sub>2</sub>S utilization in the aorta and myocardium, while at physiological concentrations, it stimulates H<sub>2</sub>S production. The phenomenon of influence of 1.25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on the H<sub>2</sub>S system is important for determining the strategy of preventing cardiovascular diseases according to varying vitamin D<sub>3</sub> status.

KEY WORDS: hydrogen sulfide; metabolism; vitamin D; calcitriol; aorta; myocardium; rats.