



«ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ»  
 «EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY»  
 Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Експериментальна медицина / Experimental medicine  
 ЕСРВ 2023, 4(98): 35–41.

УДК: 616.1:546.221.1:616-056.52:577.161.2:599.323.4

## Роль системи $H_2S$ / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза в механізмах кардіопротекторної дії вітаміну D за дієт-індукованого ожиріння

Р. С. ОСТРЕНЮК, Н. В. ЗАІЧКО

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, Україна

E-mail: ostrenyuk.r@gmail.com

**Резюме.** Ожиріння та дефіцит вітаміну D є факторами ризику серцево-судинної патології, що часто поєднуються між собою. Встановлення нових біохімічних чинників, які можуть модифікувати серцево-судинні ефекти вітаміну D за ожиріння, залишається актуальним.

**Мета:** з'ясувати роль системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза в окремих механізмах кардіопротекторної дії вітаміну D за дієт-індукованого ожиріння.

**Методи.** Досліди проведені на 40 білих лабораторних щурах-самцях згідно з принципами біоетики (Directive 2010/63/EU). Упродовж 2-х тижнів тваринам з моделлю дієт-індукованого ожиріння (ДІО) вводили активну форму вітаміну D –  $1,25(OH)_2D_3$ . Для модуляції стану системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза застосовували пропаргілглїцин та NaHS. Визначали рівні  $H_2S$ , каспази-3, TNF $\alpha$ , HSP60, HSP70, маркери оксидативного стресу в гомогенатах міокарда та грудної аорти.

**Результати.** Введення  $1,25(OH)_2D_3$  зменшувало біохімічні порушення в міокарді та аорті за ДІО: зростав вміст  $H_2S$  та активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази, знижувались рівні медіаторів запалення та апоптозу (каспази-3, TNF $\alpha$ ), нормалізувались рівні HSP60 та HSP70, зменшувались ознаки оксидативного стресу. Кардіопротекторні ефекти  $1,25(OH)_2D_3$  суттєво погіршувались за умов інгібування синтезу  $H_2S$ , тоді як донатор  $H_2S$  (NaHS), навпаки, їх посилював.

**Висновки.** За умов ожиріння модулювання активності системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза впливає на кардіопротекторні ефекти вітаміну D, які реалізуються через сигнальні системи запалення, апоптозу та оксидативний стрес.

**Ключові слова:** ожиріння, вітамін D, серцево-судинна система, гідроген сульфід, апоптоз, запалення, оксидативний стрес, кардіопротекція, метаболізм, щури.

## The role of the H<sub>2</sub>S / cystathionine-γ-lyase system in the mechanisms of cardioprotective action of vitamin D in diet-induced obesity

R. S. OSTRENYUK, N. V. ZAICHKO

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

E-mail: ostrenyuk.r@gmail.com

**Abstract.** Obesity and vitamin D deficiency are risk factors for cardiovascular disease that are often coexisting. The identification of new biochemical factors that may modify the cardiovascular effects of vitamin D in obesity remains relevant.

**The aim of study:** to estimate the role of the H<sub>2</sub>S / cystathionine-γ-lyase system in the mechanisms of cardioprotective effect of vitamin D in diet-induced obesity.

**Methods.** The experiments were carried out on 40 white male laboratory rats in accordance with the principles of bioethics (Directive 2010/63/EU). The active form of vitamin D – 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was administered to animals with a model of diet-induced obesity (DIO) for 2 weeks. Propargylglycine and NaHS were used to modulate the state of the H<sub>2</sub>S / cystathionine-γ-lyase system. Levels of H<sub>2</sub>S, caspase-3, TNFα, HSP60, HSP70, and oxidative stress markers were determined in myocardial and thoracic aortic homogenates.

**Results.** The administration of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reduced biochemical disorders in myocardium and aorta in DIO: H<sub>2</sub>S content and cystathionine-γ-lyase activity increased, levels of inflammatory and apoptotic mediators (caspase-3, TNFα) decreased, HSP60 and HSP70 levels normalized, and signs of oxidative stress decreased. The cardioprotective effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> were significantly reduced by inhibition of H<sub>2</sub>S synthesis, while the H<sub>2</sub>S donor (NaHS) enhanced these effects.

**Conclusions.** In obesity, modulation of H<sub>2</sub>S / cystathionine-γ-lyase activity affects the cardioprotective effects of vitamin D, which are realized through the signaling pathways of inflammation, apoptosis and oxidative stress.

**Key words:** obesity, vitamin D, cardiovascular system, hydrogen sulfide, apoptosis, inflammation, oxidative stress, cardioprotection, metabolism, rats.

Ожиріння та дефіцит вітаміну D є факторами ризику серцево-судинної патології, що часто поєднуються між собою [1]. Дефіцит вітаміну D асоціюється з розвитком артеріальної гіпертензії, атеросклерозу, серцевої недостатності [2]. Експериментально доведено, що 1,25-дигідроксिवітамін D<sub>3</sub> (кальцитріол) безпосередньо регулює процеси ліпогенезу та адипогенезу: пригнічує експресію багатьох ліпогенних генів (синтази жирних кислот, ацетил-КоА-карбоксилази, стеароїл-КоА-десатурази) у жировій тканині та печінці [3], інгібує термінальні стадії адипогенезу, знижує акумуляцію ліпідів, коригує дисліпідемію, дисадипокінемію та інші асоційовані з ожирінням метаболічні розлади, виявляє імуномодулюючу, протизапальну, антиапоптичну дію [4], активує експресію eNOS та антиоксидантних ензимів, зменшує ендотеліальну дисфункцію та оксидативний стрес [5]. Цілком очевидно, що прийом вітаміну D має профілакувати розвиток кардіометаболічних порушень. Однак, результати клінічних досліджень виявились контроверсійними. За результатами сліпого плацебо контрольованого дослідження, у пацієнтів з ожирінням прийом вітаміну D коригував метаболічні чинники серцево-судинної патології – знижував рівні фактора некрозу пухлини альфа, тригліцеридів та паратгормона, підвищував рівень ЛПВЩ, але при цьому не зменшував масу тіла та інші соматометричні параметри [6]. На тлі прийому вітаміну D за підвищення плазмового рів-

ня (25-OH)D понад 20 нг/мл зменшувався загальний ризик смерті, а при досягненні рівня (25-OH)D понад 30 нг/мл знижувався ризик інфаркту міокарда [7]. У більш масштабних дослідженнях (VITAL, VIDA та ін.) не виявлено зниження ризику кардіоваскулярних подій у дорослих осіб при прийомі вітаміну D [8]. Встановлення чинників, які можуть модифікувати біологічні ефекти та терапевтичну ефективність вітаміну D, залишається актуальним.

Wiliński B. et al (2012) уперше було засвідчено здатність вітаміну D підвищувати вміст вазоактивного поліфункціонального медіатора гідроген сульфід ( $H_2S$ ) в серці та інших органах здорових тварин [9]. Раніше ми встановили, що за ожиріння, індукованого висококалорійною дієтою, в серцево-судинній системі пригнічується активність  $H_2S$ -синтезуючих ензимів та формується дефіцит  $H_2S$  [10]. Тому дослідження ролі системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза у реалізації серцево-судинних ефектів вітаміну D за умов ожиріння вважаємо доцільним.

**Мета роботи:** з'ясувати роль системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза в окремих механізмах кардіопротекторної дії вітаміну D за дієт-індукованого ожиріння.

**Матеріали і методи дослідження.** Досліди проведені на 40 білих статевозрілих лабораторних щурах-самцях із початковою масою 160–190 г із дотриманням принципів біоетики відповідно до Директив Ради Європи (Directive 2010/63/EU) [11]. Тварини перебували в стандартних умовах віварію Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (із 12-годинним світловим режимом день / ніч, за температури 20–24°C, відносною вологості повітря 50–60 %, з вільним доступом до корму та води). Групи тварин формувалися випадковим чином (по 8 особин у кожній), з урахуванням масо-ростових відмінностей. Контрольна група отримувала повнораціонний гранульований корм для лабораторних гризунів (ТОВ «НВП Ф.У.Д.», Україна). У 4-х групах щурів викликали дієт-індуковане ожиріння (ДІО) відомим методом – згодовуванням висококалорійною дієтою (ВКД), що складалась з 60 % гранульованого корму, 10 % яйця, 10 % лядру, 9 % цукру, 5 % арахісу, 5 % сухого молока, 1 % соняшникової олії [12, 13]. Стан ДІО встановлювали за збільшенням соматометричного індексу Лі вище 0,310, який обчислювали як відношення кореня кубічного маси тіла (г) до довжини тіла (см) [13]. Тривалість дослідження становила 10 тижнів. Упродовж останніх 2-х тижнів три дослідні групи отримували активну форму вітаміну  $D_3$  – 1,25 (OH) $_2D_3$  (Calcitriol Teva, Teva Italia S.r.l.) у дозі 0,1 мкг/кг інтрагастрально у вигляді масляної суспензії 1 раз на добу. Для модифікації стану системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза двома групами щурів з ДІО + 1,25 (OH) $_2D_3$  вводили інгібітор – пропаргілгліцин (ППГ, Sigma-Aldrich, USA) у дозі 50 мг/кг або натрію гідросульфід (NaHS, Sigma-Aldrich, USA) у дозі 1 мкг/кг, відповідно, 1 раз на добу інтраперитонеально у вигляді водних розчинів. Контрольні тварини отримували еквівалентні кількості розчинників. Евтаназію тварин проводили шляхом декапітації під тиопенталовим наркозом (100 мг/кг і/п).

Міокард та грудну аорту гомогенізували в охолоджену середовищі 1,15 % KCl при 3000 об/хв (тефлон-скло), центрифугували 30 хв при 600 г при 4°C, відбирали проби постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf, зберігали при -20°C до виконання досліджень.

Для оцінки кардіопротекторної дії 1,25 (OH) $_2D_3$  визначали рівні ключових медіаторів запалення, апоптозу, маркери оксидативного стресу в міокарді. Рівні фактора некрозу пухлин альфа (TNF $\alpha$ ), білків теплового шоку (HSP60, HSP70), каспази-3 визначали методом ELISA для розчинних протеїнів [14] із використанням комерційних наборів моноклональних (первинних) антитіл до досліджуваних протеїнів та поліклональних (вторинних) антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому (Santa Cruz Biotechnology, США). Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [15], карбонільних груп – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідра-

зином [16]. Стан системи  $H_2S$  за дії модюляторів оцінювали в міокарді та аорті. Вміст  $H_2S$  у тканинах визначали спектрофотометричним методом за *Wiliński* [9]. Активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) в реакції синтезу  $H_2S$  з L-цистеїну визначали за *Stipanuk, Beck* [17] у модифікації [18]. Вміст протеїну визначали за *Lowry* [19].

Статистичну обробку результатів проводили в пакеті 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 дослідження та їх обговорення.** Результати наших досліджень підтвердили, що у щурів з ДІО в міокарді та аорті реєструється нижчий рівень  $H_2S$  (на 29,8 та 30,1 %,  $p < 0,001$ ) та нижча активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази (на 27,1 та 43,4 %,  $p < 0,05$ ) порівняно з групою контролю (табл.). У щурів з ДІО, що отримували 1,25  $(OH)_2D_3$ , в міокарді та аорті реєструвався більш високий рівень  $H_2S$  (на 22,3 та 24,8 %,  $p < 0,05$ ) та вища активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази (на 30,7 та 47,8 %,  $p < 0,05$ ) порівняно з групою ДІО. Введення ППГ (інгібітора реакцій десульфування L-цистеїну) нівелювало стимулюючий вплив 1,25  $(OH)_2D_3$  на активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази і поглиблювало дефіцит  $H_2S$  у міокарді та аорті щурів з ДІО. Проте, введення NaHS потенціювало ефект 1,25  $(OH)_2D_3$  на систему  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза в серцево-судинній системі щурів з ДІО.

Таблиця

**Вплив 1,25  $(OH)_2D_3$  на стан системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза в серцево-судинній системі щурів з дієт-індукованим ожирінням за дії пропаргілгліцину та NaHS ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ )**

Групи тварин (n = 8)		Рівень $H_2S$ , нмоль/мг протеїну		Активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази, нмоль $H_2S$ /хв на 1 мг протеїну	
		міокард	аорта	міокард	аорта
1	Контроль	3,12 $\pm$ 0,11	2,19 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,11
2	ДІО	2,19 $\pm$ 0,07***	1,53 $\pm$ 0,09***	0,75 $\pm$ 0,07*	0,69 $\pm$ 0,08*
3	ДІО + 1,25 $(OH)_2D_3$	2,68 $\pm$ 0,15**	1,91 $\pm$ 0,09**	0,98 $\pm$ 0,08#	1,02 $\pm$ 0,09#
4	ДІО + 1,25 $(OH)_2D_3$ + ППГ	1,67 $\pm$ 0,08***§	0,73 $\pm$ 0,05***§	0,58 $\pm$ 0,02***§	0,79 $\pm$ 0,07*§
5	ДІО + 1,25 $(OH)_2D_3$ + NaHS	3,64 $\pm$ 0,20**§	3,09 $\pm$ 0,17***§	1,14 $\pm$ 0,06#	1,47 $\pm$ 0,19 #§

**Примітки:** 1) \* – статистично значущі відмінності стосовно групи 1 (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ); 2) # – статистично значущі відмінності стосовно групи 2 (# –  $p < 0,05$ ); 3) § – статистично значущі відмінності стосовно групи 3 (§ –  $p < 0,05$ ).

Модуляція рівня ендogenous  $H_2S$  у серцево-судинній системі суттєво відображалась на реалізації кардіопротекторного ефекту активної форми вітаміну D (рис.). Так, у міокарді щурів з ДІО спостерігалось підвищення рівня каспази-3, TNF $\alpha$ , Hsp60 (на 63,1; 113; 34,3 %,  $p < 0,01$ ) і зниження рівня Hsp70 (на 20,7 %,  $p < 0,05$ ), підвищення рівня МДА та карбонільних груп (на 63,8 та 70,1 %,  $p < 0,01$ ) порівняно з контролем, що свідчить про активацію прозапальних та проапоптичних процесів, посилення вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів. Введення 1,25  $(OH)_2D_3$  справляло протизапальний та протиапоптичний ефект: забезпечувало зниження рівнів каспази-3, TNF $\alpha$ , Hsp60 (на 26,5; 33,7; 17,8 %,  $p < 0,05$ ) та підвищення рівня Hsp70 (на 23,9 %,  $p < 0,05$ ), зменшувало ознаки оксидативного стресу зі зниженням рівня МДА та карбонільних груп (на 30,9 і 28,9 %,  $p < 0,05$ ) у міокарді щурів з ДІО. Введення ППГ суттєво зменшувало кардіопротекторні ефекти 1,25  $(OH)_2D_3$ , тоді як введення NaHS, навпаки, їх посилювало. Зокрема, у щурів у групі ДІО + 1,25  $(OH)_2D_3$  + NaHS рівні каспази-3, TNF $\alpha$ ,

Hsp60 були нижчими (на 43,5; 49,9; 29 %,  $p < 0,05$ ), а рівень Hsp70 – вищим (на 34,8 %,  $p < 0,05$ ) порівняно з групою 2. Також застосування NaHS поряд із 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> більш суттєво зменшувало ознаки оксидативного стресу в міокарді щурів з ДІО: у цій групі рівні МДА та карбонільних груп були нижчими (на 25,4 та 30,8 %,  $p < 0,05$ ), ніж в групі ДІО + 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

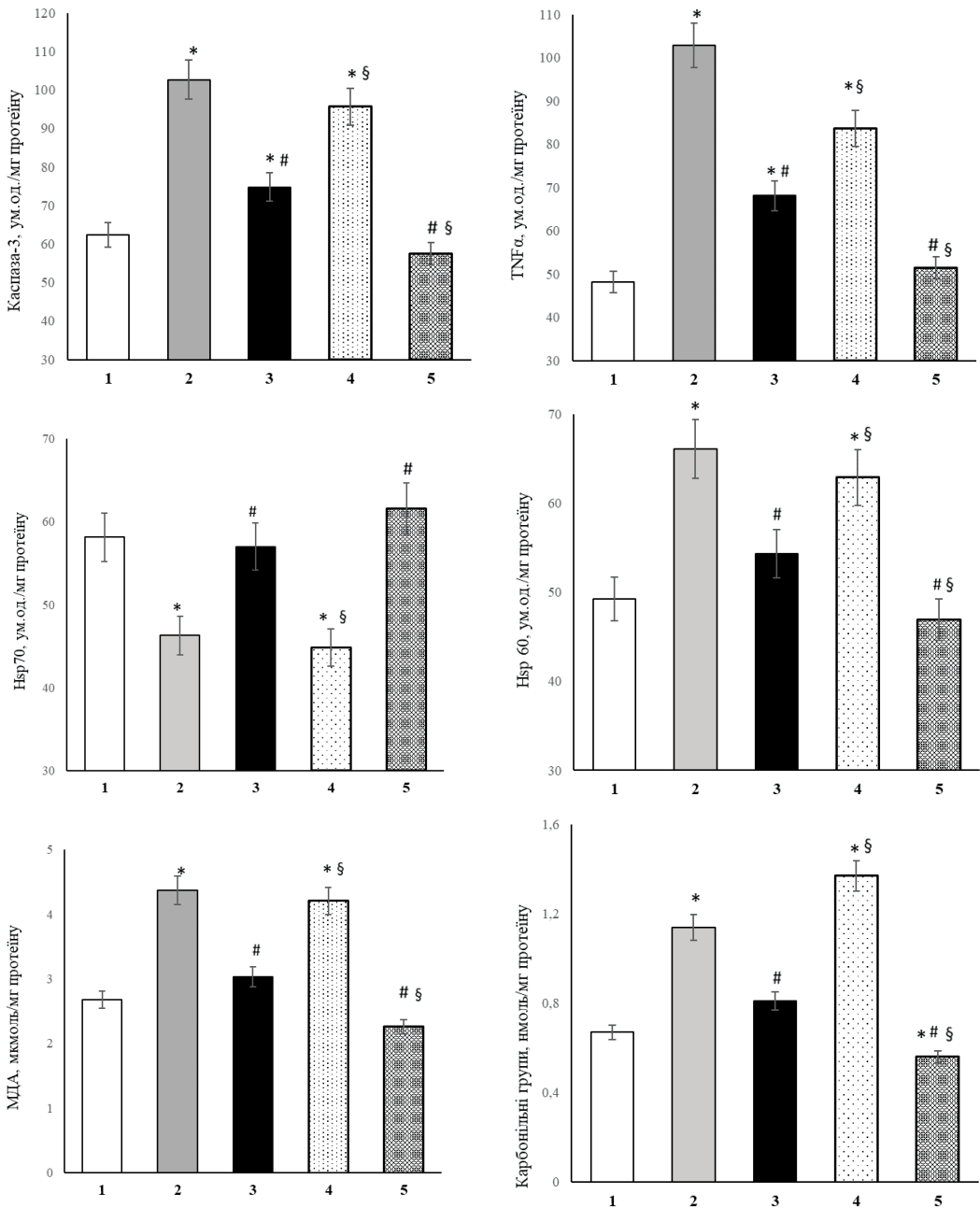


Рис. Вплив 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> на медіатори запалення, апоптозу, маркери оксидативного стресу в міокарді щурів з дієт-індукованим ожирінням (ДІО) за дії пропаргілгліцину та NaHS (M±m, n = 8)

**Примітки:** 1) групи щурів: 1 – контроль; 2 – ДІО; 3 – ДІО + 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 4 – ДІО + 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> + ППГ; 5 – ДІО + 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> + NaHS; 2) статистично значущі відмінності ( $p < 0,05$ ) – \* стосовно групи 1; # – стосовно групи 2; § – стосовно групи 3.

Отже, стан системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза впливає на реалізацію кардіопротекторних властивостей вітаміну D, які опосередковуються через регуляцію рівнів сигнальних та ефекторних молекул (каспази-3, TNF $\alpha$ , Hsp60, Hsp70). Вказані медіатори відіграють важливу роль у механізмах ушкодження міокарда, ремоделювання серця та судин, розвитку серцевої недостатності. Hsp70 виявляє кардіопротекторну дію – за ішемії-реперфузії пригнічує апоптоз, запалення та вільнорадикальне окиснення, посилює стресову адаптацію кардіоміоцитів, але при вивільненні з пошкоджених тканин у плазму крові цей білок діє як прозапальний медіатор [20, 21]. Hsp60 регулює мітохондріальний гомеостаз та енергозабезпечення клітин, екстрацелюлярна фракція стимулює розвиток ендотеліальної дисфункції та атеросклерозу [22]. Hsp60 взаємодіє з різними білками апоптозу, виявляє протиапоптичну та антиапоптичну дію, бере участь в активації прокаспази 3 в ефекторну каспазу-3 [23]. Зв'язок між системою  $H_2S$  і білками теплового шоку за умов ожиріння потребує подальшого вивчення.

**Висновки.** Вітамін D залучений до регуляції активності системи  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза в серцево-судинній системі і запобігає формуванню дефіциту ендogenous гідроген сульфід у дієт-індукованого ожиріння. Система  $H_2S$  / цистатіонін- $\gamma$ -ліаза відіграє важливу роль у реалізації кардіопротекторної дії вітаміну D за ожиріння. За дії інгібітора цистатіонін- $\gamma$ -ліази поглиблюється дефіцит  $H_2S$  у серцево-судинній системі, що асоціюється з суттєвим зниженням протизапальної, антиапоптичної та антиоксидантної дії активної форми вітаміну D (1,25 (OH) $_2$ D $_3$ ). Донатор  $H_2S$  посилює кардіопротекторні ефекти вітаміну D, які реалізуються через зниження рівнів каспази-3, TNF $\alpha$ , коригування рівнів білків теплового шоку (Hsp70, Hsp60), пригнічення оксидативного стресу. Встановлення молекулярних механізмів впливу  $H_2S$  на реалізацію біологічної дії вітаміну D за різних патологічних станів є актуальним напрямом подальших досліджень.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Внесок авторів.** Остренюк Р. С. – концепція роботи та дизайн, збір, аналіз і статистична обробка результатів, написання статті. Заїчко Н. В. – критичний огляд та остаточне затвердження статті.

#### ПОСИЛАННЯ

1. Vranić L, Mikolašević I, Milić S. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? *Medicina* (Kaunas). 2019 Aug;55(9):541. doi.org/10.3390/medicina55090541.
2. Latic N, Erben RG. Vitamin D and cardiovascular disease, with emphasis on hypertension, atherosclerosis, and heart failure. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep;21(18):6483. doi.org/10.3390/ijms21186483.
3. Kang EJ, Lee JE, An SM, Lee JH, Kwon HS, Kim BC, et al. The effects of vitamin D3 on lipogenesis in the liver and adipose tissue of pregnant rats. *Int J Mol Med*. 2015 Oct;36(4):1151-8. doi.org/10.3892/ijmm.2015.2300.
4. Szymczak-Pajor I, Miazek K, Selmi A, Balcerczyk A, Śliwińska A. The action of vitamin D in adipose tissue: is there the link between vitamin D deficiency and adipose tissue-related metabolic disorders? *Int J Mol Sci*. 2022 Jan;23(2):956. doi.org/10.3390/ijms23020956.
5. Wee CL, Mokhtar SS, Singh KKB, Yahaya S, Leung SWS, Rasool AHG. Calcitriol supplementation ameliorates microvascular endothelial dysfunction in vitamin D-deficient diabetic rats by upregulating the vascular eNOS protein expression and reducing oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Feb ;2021:3109294. doi.org/10.1155/2021/3109294.
6. Zittermann A, Frisch S, Berthold HK, Götting C, Kuhn J, Kleesiek K et al. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *Am J Clin Nutr*. 2009 Mar;89(5):1321-27. doi.org/10.3945/ajcn.2008.27004.
7. Acharya P, Dalia T, Ranka S, Sethi P, Oni OA, Safarova MS et al. The Effects of Vitamin D supplementation and 25-hydroxyvitamin D levels on the risk of myocardial infarction and mortality. *J Endocr Soc*. 2021 Dec;5(10):124. doi.org/10.1210/jendso/bvab124.
8. Pilz S, Trummer C, Theiler-Schwetz V, Grübler MR, Verheyen ND, Odler B et al. Critical appraisal of large vitamin D randomized controlled trials. *Nutrients*. 2022 Jan;14(2):303. doi.org/10.3390/nu14020303.
9. Wiliński B, Wiliński J, Somogyi E, Piotrowska J, Opoka W. Vitamin D $_3$  (cholecalciferol) boosts hydrogen sulfide tissue concentrations in heart and other mouse organs. *Folia Biol* (Krakow). 2012;60(3-4):243-7. doi.org/10.3409/fb60\_3-4.243-247.

10. *Bobetska OP, Zaichko NV*. The effect of lipoic acid, zinc sulfate and sodium thiosulfate on H<sub>2</sub>S metabolism in cardiovascular system of rats in experimental obesity. *Bulletin of problems in biology and medicine*. 2023; 4 (171): 134-45. doi.org/10.29254/2077-4214-2023-4-171-134-145.
11. **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>.
12. *Shen XH, Tang QY, Huang J, Cai W*. Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Jan;235(1):47-51. doi.org/10.1258/ebm.2009.009122.
13. *Karpovets TP, Shabanova NV, Konopelnyuk VV, Savchuk OM, Ostapchenko LI*. High-calorie diet as a factor of obesity development in rats. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological System)*. 2014;6(2):139–142.
14. *Crowther JR*. The ELISA Guidebook. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc; 2001, 436.
15. *Mihara M, Uchiyama M*. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86(1):271-8. doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1.
16. *Gasparini PVF, Matias AM, Torezani-Sales S, Kobi JBBS, Siqueira JS, Corrêa CR et al*. High-fat and combined high-fat and sucrose diets promote cardiac oxidative stress independent of Nox2 redox regulation and obesity in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2021 Oct;55(5):618-34. doi.org/10.33594/000000441.
17. *Stipanuk MH, Beck PW*. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J*. 1982;206(2):267-77. doi.org/10.1042/bj2060267.
18. *Zaichko NV, Pentiuk NO, Melnik AV, Shtatko OL, Andrushko II*. Production of hydrogen sulfide in organs of rats. *Medical chemistry*. 2009;11(4):7-13.
19. *Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.
20. *Song YJ, Zhong CB, Wang XB*. Heat shock protein 70: A promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Cell Physiol*. 2019;234(2):1190-207. doi.org/10.1002/jcp.27110.
21. *Kostrycki IM, Wildner G, Donato YH, Dos Santos AB, Beber LCC, Frizzo MN et al*. Effects of high-fat diet on eHSP72 and extra-to-intracellular HSP70 levels in mice submitted to exercise under exposure to fine particulate matter. *J Diabetes Res*. 2019 Jan;2019:4858740. doi.org/10.1155/2019/4858740.
22. *Krishnan-Sivadoss I, Mijares-Rojas IA, Villarreal-Leal RA, Torre-Amione G, Knowlton AA, Guerrero-Beltrán CE*. Heat shock protein 60 and cardiovascular diseases: An intricate love-hate story. *Med Res Rev*. 2021;41(1):29-71. doi.org/10.1002/med.21723.
23. *Chandra D, Choy G, Tang DG*. 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. *J Biol Chem*. 2007 Oct;282(43):31289-301. doi.org/10.1074/jbc.M702777200.