

УДК 546.221.1: 616.61:616.379-008.64:612.08
DOI 10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13352

О. Б. Струтинська, А. В. Мельник

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

РОЛЬ СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ НЕФРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ МЕТФОРМІНУ ЗА СТРЕПТОЗОТОЦИН- ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ

Роль системи гідроген сульфїду в механїзмах
нефропротекторної дії метформїну за
стрептозотокїнїндукованого діабету

О. Б. Струтинська, А. В. Мельник

Вінницький національний медичний університет
їмені М. І. Пирогова

Резюме. Дїабетична нефропатїя – поширене мї-
кросудинне ускладнення цукрового діабету (ЦД), яке
розвивається приблизно у 40 % хворих на ЦД 2 типу.
З метою лїкування дїабетичного ураження нирок ши-
роко використовується «Метформїн» – препарат, що
контролює рївень глїкемїї та має доведенї нефропро-
текторнї властивостї. На сьогодні не досліджено роль
системи H_2S у механїзмах нефропротекторної актив-
ностї метформїну.

Мета дослідження – оцїнити вплив модуляторів
обмїну H_2S на основнї механїзми нефропротекторної
дії метформїну за експериментального цукрового діа-
бету.

Матеріали і методи. Експериментальнї дослі-
дження проведено на 75 білих нелїнійних щурах-сам-
цях, яких подїлили на 5 груп: перша – контроль; друга
група – тварини з експериментальним ЦД, який іні-
ціювали одноразовим інтраперитонеальним введен-
ням стрептозотокїну (40 мг/кг маси); третя гру-
па – тварини з експериментальним ЦД, які з 3 до 28
доби отримували лїкування метформїном (500 мг/кг/
добу, інтрагастрально); четверта – щури з ЦД, яким
метформїн вводили разом з NaHS (56 мкмоль/кг/добу,
інтрагастрально); п'ята група – тварини з ЦД, яким
метформїн вводили разом з пропаргїлгліцином (ППГ,
442 мкмоль/кг/добу, інтрагастрально). У периферїйній
кровї визначали вміст глюкози, а в супернатанті гомо-
генату нирок оцїнювали рївень H_2S , галектину-3, кас-
пази-3, IL-1 β , малонового дїальдегїду (МДА), карбонїль-
них груп протеїнів (КГП), активностї НАДФН-оксидази
та супероксиддисмутази (СОД).

Результати. Встановлено, що застосування
метформїну за експериментально ЦД виявляло ан-
тиоксидантну (рївень МДА та КГП зменшувався на
24,7–27,4 %, $p < 0,001$), протизапальну (рївень IL-1 β зни-
жувався на 25,3 %, $p < 0,001$), антиапоптотичну (рївень
каспази-3 зменшувався на 36,1 %, $p < 0,001$) та анти-
фїброгенну (рївень галектину знижувався на 48,4 %, $p < 0,001$) дії у нирках, що асоціювалось зї збїльшенням

The role of the hydrogen sulfide system in the
nephroprotection mechanisms of metformin action on
streptozotocin-induced diabetes

O. B. Strutynska, A. V. Melnyk

M. Pyrohov Vinnytsia National Medical University

e-mail: strutinskaa032@gmail.com

Summary. Diabetic nephropathy is a common
microvascular complication of diabetes mellitus (DM), which
develops in approximately 40 % of patients with type 2 DM.
For the treatment of diabetic kidney damage, metformin
is widely used – a drug that controls blood glucose levels
and has proven nephroprotective properties. In present
time, the role of the H_2S system in the mechanisms of
the nephroprotective activity of metformin has not been
investigated.

The aim of the study – to assess the influence of
modulators of H_2S exchange on the main mechanisms
of nephroprotective action of metformin in experimental
diabetes.

Materials and Methods. Experimental studies were
conducted on 75 white non-linear male rats, which were
divided into five groups: group 1 – control; group 2 –
animals with experimental diabetes, which was initiated
by a single intraperitoneal injection of streptozotocin
(40 mg/kg of weight); group 3 – animals with experimental
diabetes, which were treated with metformin (500 mg/kg/
day, intragastrically) from the 3rd to the 28th day; group
4 – animals with DM, which were administered metformin
together with NaHS (56 μ mol/kg/day, intragastrically);
group 5 – animals with diabetes, to which metformin
was administered together with propargylglycine (PPG,
442 μ mol/kg/day, intragastrically). Glucose content was
determined in peripheral blood, and the level of H_2S ,
galectin-3, caspase-3, IL-1 β , malondialdehyde (MDA),
protein carbonyl groups (PCG), NADPH oxidase and
superoxide dismutase (SOD) activity was assessed in the
supernatant of the kidney homogenate.

Results. It was established that the use of metformin
in experimental diabetes showed antioxidant (the level
of MDA and PCG decreased by 24.7–27.4%, $p < 0.001$),
anti-inflammatory (the level of IL-1 β decreased by 25.3 %, $p < 0.001$), antiapoptotic (the level of caspase-3 decreased
by 36.1 %, $p < 0.001$) and antifibrogenic (the level of galectin
decreased by 48.4 %, $p < 0.001$) activity in the kidneys,
which was associated with an increase (by 27.9 %,

©О. Б. Струтинська, А. В. Мельник, 2023

(на 27,9 %, $p < 0,001$) рівня H_2S ($|r_s| = 0,59-0,75$, $p < 0,01$). Використання модуляторів обміну H_2S модифікувало нефропротекторні властивості метформіну за ЦД. Введення донора гідроген сульфідів NaHS потенціювало захисний вплив метформіну на нирки: рівні галектину-3, каспази-3, IL-1 β , MDA та КГП у нирках були вірогідно меншими відповідно на 18–37 % ($p < 0,001$), ніж у тварин, які отримували лише метформін. Разом з тим, використання інгібітора синтезу гідроген сульфідів ППГ вірогідно зменшувало ренопротективну активність метформіну.

Висновки. Проведенні дослідження засвідчили вагому роль системи H_2S у реалізації протизапальної, антифіброгенної, антиапоптотичної та антиоксидантної дії метформіну в нирках за ЦД. Поряд з цим, отримані результати патогенетично обґрунтовують доцільність використання донорів H_2S для потенціювання нефропротекторних властивостей метформіну.

Ключові слова: гідроген сульфід; запалення; апоптоз; фіброз; оксидативний стрес; метформін; NaHS; пропаргілгліцин; цукровий діабет.

ВСТУП

Діабетична нефропатія – найбільш поширене мікросудинне ускладнення цукрового діабету (ЦД), яке асоціюється з високою смертністю від серцево-судинної патології та термінальної ниркової недостатності [1]. Ураження нирок розвивається приблизно у 30 % за ЦД 1 типу та у 40 % за ЦД 2 типу [2]. Діабетична хвороба нирок характеризується стійкою альбумінурією, прогресивним зниженням гломерулярної фільтрації, часто асоціюється з підвищенням артеріального тиску та врешті-решт призводить до розвитку уремії [3]. Висока поширеність діабетичної нефропатії та смертність від цього ускладнення більшою мірою пов'язана з невирішенням питань патогенезу та ефективного лікування. Тому актуальним залишається вивчення нових механізмів розвитку діабетичної нефропатії і обґрунтування нових підходів до її корекції.

Останнім часом активно досліджують роль газотрансміттера H_2S у механізмах ураження нирок та нефропротекції за експериментального ЦД. Показано, що за ЦД порушується обмін H_2S , виникає дефіцит H_2S у нирках, що асоціюється з розвитком фільтраційної недостатності та тубулярними uszkodженнями [4, 5]. Використання донорів H_2S виявляло нефропротективну активність за ЦД, тоді як інгібітори синтезу H_2S (наприклад пропаргілгліцин) – збільшували масштабність структурних та функціональних порушень нирок [6].

Одним із основних препаратів, який широко використовують для лікування ЦД 2 типу, є «Метформін». Поряд із потужною гіпоглікемічною дією він коригує фільтраційну функцію нирок, тубулярну дисфункцію, зменшує активність запального процесу,

$p < 0,001$) of H_2S level ($|r_s| = 0,59-0,75$, $p < 0,01$). The use of H_2S modulators modified the nephroprotective properties of metformin in diabetes condition. Administration of NaHS (the hydrogen sulfide donor) potentiated the protective effect of metformin in the kidneys: the levels of galectin-3, caspase-3, IL-1 β , MDA, and PCG in the kidneys were significantly lower, respectively, by 18–37 % ($p < 0,001$) than in animals that received only metformin. At the same time, the use of the PPG (hydrogen sulfide synthesis inhibitor) probably reduced metformin protective activity in the kidney.

Conclusions. The conducted studies proved the important role of the H_2S system in the implementation of anti-inflammatory, anti-fibrogenic, anti-apoptotic and antioxidant effects of metformin in the kidneys in diabetes condition. Along with this, the obtained results pathogenetically substantiate the expediency of H_2S donors using to potentiate the nephroprotective properties of metformin.

Key words: hydrogen sulfide; inflammation; apoptosis; fibrosis; oxidative stress; metformin; NaHS; propargylglycine; diabetes.

апоптозу, нефросклерозу за діабетичної нефропатії [7, 8]. На сьогодні не досліджено роль системи H_2S у механізмах нефропротекторної активності метформіну. Також не вивчено здатність модуляторів обміну H_2S модифікувати в нирках протизапальну, антиапоптотичну, антифіброгенну та антиоксидантну дії метформіну за ЦД.

Метою дослідження було оцінити вплив модуляторів обміну H_2S на основні механізми нефропротекторної дії метформіну за експериментального цукрового діабету.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експериментальні дослідження провели на 75 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях (*Rattus norvegicus*) із початковою масою тіла 150–240 г, яких отримали з експериментальної біологічної клініки (віварію) Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) імені М. І. Пирогова. Усіх лабораторних тварин утримували на стандартному харчовому раціоні віварію ВНМУ імені М. І. Пирогова при звичайному світловому й температурному режимі. Всі етапи досліджень виконано за загальними етичними принципами експериментів на тваринах згідно з Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), а також Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження». В ході експерименту тварин поділили на п'ять груп (по 15 щурів у кожній). Перша група – контрольна, отримувала інтраперитонеально

0,1 М цитратний буфер з рН 4,5 (0,1 мл/ 100 г маси). У другій, третій, четвертій та п'ятій групах тварин моделювали цукровий діабет шляхом одноразового інтраперитонеального введення свіжоприготовленого розчину стрептозотоцину (Sigma, США) на 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5) в дозі 40 мг/кг маси щура [9]. Через 72 год після ін'єкції стрептозотоцину визначали рівень глюкози в периферійній крові й для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії більше 16,7 ммоль/л. З 3-ї до 28-ї доби щурам третьої, четвертої та п'ятої груп вводили інтрагастрально метформін (Берлін-Хемі, Німеччина) в дозі 500 мг/кг 1 раз на добу на 1% крохмальному гелі (з розрахунку 1 мл на 100 г маси тіла) [10]. Щурам четвертої групи поряд із метформіном вводили донор H_2S - $NaHS \cdot H_2O$ (Sigma, США) у дозі 56 мкмоль/кг 1 раз на добу інтраперитонеально [11]. Щурам п'ятої групи поряд із метформіном вводили інгібітор синтезу H_2S - D,L-пропаргілгліцин (ППГ, Sigma, США) у дозі 442 мкмоль/кг маси 1 раз на добу інтраперитонеально [11].

Біохімічні дослідження виконано на базі науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ імені М. І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про атестацію № 04915). Тварин знеживлювали методом декапітації під пропофоловим наркозом («Fresenius Kabi» 60 мг/кг в/о).

Для досліджень використовували периферійну кров із хвостової вени та пост'ядерний супернатант гомогенату нирок. Периферійну кров отримували з кінчика хвоста шляхом нанесення поверхневих насічок із використанням скарифікатора, сироватку крові – центрифугуванням цільної венозної крові при 1500 об./хв протягом 20 хв.

З метою оцінки рівня H_2S нирки промивали холодним 1,15 % розчином KCl, подрібнювали та гомогенізували в середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об./хв (тефлон-скло). До 1 мл отриманого гомогенату додавали 0,25 мл 50 % ТХО, центрифугували при 1200 г 15 хв і відбирали супернатант, який зразу ж використовували для досліджень.

Для інших досліджень супернатант гомогенату нирок отримували наступним чином: нирки гомогенізували в середовищі 0,25 М сахарози, 0,01 М Трис (рН 7,4) у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об.хв (тефлон-скло), далі центрифугували протягом 30 хв при 600 г за температури 4–6 °С, відбирали аліквоти пост'ядерного супернатанту в мікропробірці Ерпендорф і до проведення досліджень зберігали при -20 °С.

Вміст глюкози в периферійній крові оцінювали з допомогою глюкометра Accu-Chek Active (Rouche Group, Німеччина). Вміст H_2S визначали у супернатанті гомогенату нирок спектрофотометричним методом за реакцією утворення метиленового синього при наявності N,N-диметил-пара-фенілендіаміном

та $FeCl_3$ [12]. Рівень галектину-3, каспази-3 та IL-1 β визначали імуноферментними методами з використанням відповідних наборів «Rat Galectin 3 (GAL-3) ELISA Kit» (MyBiosource, Cat № MBS2600708), «Rat Caspase-3 ELISA Kit» («Elabscience Biotechnology Inc.», США) «Rat IL-1 β ELISA Kit» («Elabscience Biotechnology Inc.», США) згідно з інструкціями фірм-виробників. Детекцію проводили на аналізаторі STAT-FAX 303+ (США) при довжині хвилі 450 нм (диференційний фільтр – 630 нм).

Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [13], карбонільних груп протеїнів (КГП) – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразинном [14]. Активність супероксиддисмутази оцінювали за відсотком гальмування окиснення кверцетину [15], НАДФН-оксидази – за ступенем поглинання НАДФН при 340 нм [16]. Вміст загального білка визначали методом Лоурі [17].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми SPSS Statistica 17.0. Результати представляли у вигляді середньої арифметичної та середньої помилки середньої ($M \pm m$). Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Колмогорова – Смірнова. Достовірність різниці між показниками визначали залежно від типу розподілу: при нормальному розподілі – за параметричним t-критерієм Стьюдента, а розподілі, який відхиляється від нормального, – за непараметричним U-критерієм Манна – Уїтні. Зв'язок між показниками визначали за допомогою кореляційного аналізу за Спірманом. Вірогідними вважали дані при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Спершу ми оцінили вміст H_2S в нирках у щурів на тлі стрептозотоцинуіндукованого діабету (СТЦ-діабету) та за умов введення метформіну й модуляторів обміну гідроген сульфіді (табл. 1). Виявилось, що СТЦ-діабет супроводжується вірогідним зниженням вмісту H_2S в нирках на 33,2 % порівняно з контролем. За умов застосування метформіну рівень H_2S в нирках на 27,9 % перевищував такий показник у групі нелікованих тварин. Використання NaHS посилювало коригуючий вплив метформіну на рівень H_2S в нирках за СТЦ-діабету – його середня величина була на 13,5 % більшою, ніж в групі «СТЦ-діабет + Метформін». Разом з тим, пропаргілгліцин зменшував позитивний вплив метформіну на вміст H_2S в нирках – його середній показник на 19,5 % поступався такому в групі «СТЦ-діабет + Метформін».

Далі ми оцінили вплив модуляторів обміну гідроген сульфіді на антифіброгенну, протизапальну та антиапоптотичну дії метформіну в нирках за СТЦ-діабету (табл. 2). З'ясувалось, що на 28 добу після введення стрептозотоцину реєструється вірогідне зростання в нирках рівнів маркера фіброзу галектину-3 в 5,3 раза, проапоптотичного фактора

Таблиця 1. Вплив метформіну та його комбінації із модуляторами обміну H₂S на вміст H₂S у нирках щурів із стрептозотозиндукованим діабетом (M±m, n=15)

Група тварин	H ₂ S, нмоль/мг протеїну	p
Контрольна група	3,65±0,12	–
СТЦ-діабет	2,44±0,10	p ₁₋₂ <0,001
СТЦ-діабет + Метформін	3,12±0,14	p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ <0,001
СТЦ-діабет + Метформін + NaHS	3,54±0,14	p ₁₋₄ >0,05 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ <0,05
СТЦ-діабет + Метформін + ППГ	2,51±0,09	p ₁₋₅ <0,001 p ₂₋₅ >0,05 p ₃₋₅ <0,001

Таблиця 2. Вплив метформіну та його комбінації із модуляторами обміну гідроген сульфїду на біохімічні маркери фіброгенезу, запалення та апоптозу в нирках щурів за стрептозотозиндукованого діабету (M±m, n=15)

Група тварин	Галектин-3, пг/мг протеїну	Каспаза-3, нг/мг протеїну	IL-1β пг/мг протеїну
Контрольна група	58,9±1,98	0,320±0,021	45,7±1,33
СТЦ-діабет	312±8,18***	1,80±0,09***	95,3±1,88***
СТЦ-діабет + Метформін	161±3,07***&&&	1,15±0,05***&&&	71,2±1,81***&&&
СТЦ-діабет + Метформін + NaHS	3,20±0,14&&#	0,871±0,039&&&###	2,25±0,16&&&###
СТЦ-діабет + Метформін + ППГ	4,76±0,15***&&&##	1,55±0,04***&&&##	3,52±0,14***&&#

Примітки: 1) * – статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (** – p<0,01, *** – p<0,001);
2) & – статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин із СТЦ-діабетом (&& – p<0,01, &&& – p<0,001);
3) # – статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин із СТЦ-діабет+ Метформін (# – p<0,05, ## – p<0,01, ### – p<0,001).

каспази-3 – у 5,6 раза та прозапального цитокіну IL-1β – в 2,1 раза відносно контролю. За цих умов використання метформіну супроводжується вірогідним зменшенням в нирках активності фіброгенезу (рівень галектину знижувався на 48,4 %), апоптозу (рівень каспази-3 зменшувався на 36,1 %) та запалення (рівень IL-1β знижувався на 25,3 %), відносно нелікованих тварин із СТЦ-діабетом. Застосування модуляторів обміну H₂S мало різновекторний вплив на антифіброгенну, протизапальну та антиапоптотичну дії метформіну за СТЦ-діабету. Так, введення H₂S донору потенціувало вказані ефекти метформіну: рівні галектину-3, каспази-3 та IL-1β в нирках були вірогідно меншими відповідно на 36,6; 37,0 та 18,0 %, ніж в групі тварин, які отримували лише метформін. Разом з тим, використання інгібітора синтезу H₂S чинило депримуєчий вплив на вказані механізми нефропротекторної дії метформіну – вміст галектину-3, каспази-3 та IL-1β в нирках були вірогідно більшими відповідно на 41,6; 28,7 та 18,4 %, ніж в групі тварин, яка отримувала лише метформін.

У наступній частині роботи ми дослідили вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на стан про- та антиоксидантних систем, а також активність вільнорадикального окиснення ліпідів та проте-

нів у нирках на тлі застосування метформіну в щурів за СТЦ-діабету (табл. 3). Встановлено, що СТЦ-діабет супроводжується індукцією в нирках ліпопероксидації та окисної деструкції протеїнів на тлі дисбалансу в ензиматичній системі про- та антиоксидантів. У групі тварин «СТЦ-діабет» вміст біохімічних маркерів ліпопероксидації МДА, окисної модифікації протеїнів КГП та активність прооксидантного ензиму – продуценту супероксидно-аніонного радикалу НАДФН-оксидази в нирках були статистично достовірно більшими відповідно в 1,7, 2 та 2,1 раза порівняно з контролем. Поряд з цим, відмічалось вірогідне зменшення в нирках активності антиоксидантного ензиму СОД на 44,0 % відносно контролю. Застосування метформіну за СТЦ-діабету сповільнювало активність вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів і зменшувало пертурбації у системі про- та антиоксидантів. У групі тварин «СТЦ-діабет+Метформін» вміст МДА, КГП, активність НАДФН-оксидази в нирках були достовірно меншими відповідно на 27,4; 24,7 та 23,2 %, тоді як активність СОД – більшою на 21,1 % відносно нелікованих тварин. Введення модуляторів обміну H₂S модифікувало антиоксидантний потенціал метформіну, а саме NaHS стимулював, тоді як ППГ навпаки інгібував. У групі тварин «СТЦ-

Таблиця 3. Вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфїду на показники оксидативного стресу в нирках щурів за стрептозотоциніндукованого діабету ($M \pm m$, $n=15$)

Група тварин	МДА, мкмоль/мг протеїну	КГП, нмоль/мг протеїну	НАДФН-оксидаза, нмоль/хв•мг протеїну	СОД, ум.од./мг протеїну
Контрольна група	3,22±0,18	0,865±0,037	1,92±0,11	4,14±0,15
СТЦ-діабет	5,44±0,14***	1,74±0,02***	3,96±0,14***	2,32±0,13***
СТЦ-діабет + Метформін	3,95±0,17**&&&	1,31±0,03***&&&	3,04±0,13***&&&	2,81±0,14***&&&
СТЦ-діабет + Метформін + NaHS	3,20±0,14&&#	0,871±0,039&&###	2,25±0,16&&###	3,76±0,17&&###
СТЦ-діабет + Метформін + ППГ	4,76±0,15***&&###	1,55±0,04***&&###	3,52±0,14***&#	2,25±0,12***##

Примітки: 1) * – статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$);

2) & – статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин із СТЦ-діабетом (&& – $p < 0,01$, &&& – $p < 0,001$);

3) # – статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин із СТЦ-діабет + Метформін (# – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$).

діабет+Метформін+NaHS» рівень МДА, КГП, активність НАДФН-оксидази в нирках були достовірно меншими відповідно на 19,0; 33,5 та 26,0 %, активність СОД – більшою на 33,8 %, відносно тварин, які отримували лише метформін. Натомість у тварин, яким вводили ППГ зміни були протилежними: рівень МДА, КГП, активність НАДФН-оксидази в нирках були достовірно більшими відповідно на 20,5; 18,3 та 15,8 %, активність СОД – меншою на 19,9 % відносно тварин, які отримували лише метформін.

Проведені дослідження показали, що СТЦ-діабет викликає дефіцит H_2S у нирках і супроводжується рядом патохімічних порушень – розвитком оксидативного стресу, запалення, індукцією апоптозу та фіброгенезу, що знаходить своє підтвердження в літературі при проведенні подібних досліджень [5, 6]. За умов експериментального діабету застосування метформіну виявляло потужні антиоксидантну, протизапальну, антиапоптотичну та антифіброгенну дії, що не суперечать даним літератури [8, 18, 19]. Поряд з цим, виявлено, що використання метформіну підвищує запаси H_2S у нирках. За цих умов між вмістом H_2S в нирках та рівнем маркерів фіброзу, апоптозу, запалення, вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів, активністю НАДФН-оксидази виникав обернений середньої сили достовірний зв'язок ($r_s = -(0,59-0,75)$, $p < 0,001$), тоді як з активністю СОД у нирках – вірогідний прямий зв'язок ($r_s = 0,64$, $p < 0,01$). Отримані результати наводять на думку щодо причетності системи H_2S у нирках до механізмів реалізації нефропротекторних властивостей метформіну за ЦД. Разом з тим, у літературі існує дуже обмежена інформація щодо цього питання – лише в одній роботі показано, що метформін за ЦД виявляє потужні антиоксидантні властивості, що асоціюється з його здатністю підвищувати рівень H_2S у нирках [5, 6].

З метою отримання доказів можливої причетності системи H_2S до механізмів ренопротективної дії метформіну ми провели дослідження впливу інгібітора синтезу H_2S – ППГ та донора H_2S – NaHS на протизапальну, антифіброгенну, антиапопто-

тичну та антиоксидантну дії метформіну в нирках за ЦД. Виявилось, що NaHS вірогідно потенціює коригуючий вплив метформіну на процеси запалення, фіброзу, апоптозу та оксидативного стресу в нирках за СТЦ-діабету, тоді як використання ППГ виявляло протилежну дію, активність вказаних патохімічних процесів у нирках наближалась до такої у тварин з ЦД без корекції. Виникає питання щодо молекулярних мішеней, через які може опосередковуватись стимулюючий вплив NaHS на нефропротекторні властивості метформіну за ЦД. Так, протизапальна активність в нирках асоціюється зі зменшенням експресії ядерного фактора NF- κ B, блокуванням мітогенактивованого протеїнкіназного (MAPK) сигналіну, що веде до зниження продукції прозапальних цитокінів [6, 11]. Антифіброгенний потенціал гідроген сульфїду опосередковується через зниження активності ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, блокування сигнальних шляхів, залежних від MAPK та трансформуючого фактора росту (TGF- β), які стимулюють процеси ремоделювання сполучної тканини [9, 21]. Антиоксидантна дія донорів гідроген сульфїду супречена з посиленням експресії ядерного фактора Nrf2, що веде до зростання активності антиоксидантного ензиму СОД та зниження активності прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази [22].

Проведенні дослідження засвідчили вагому роль системи H_2S у реалізації протизапальної, антифіброгенної, антиапоптотичної та антиоксидантної дії метформіну в нирках за ЦД. Поряд з цим, отримані результати патогенетично обґрунтують доцільність використання донорів H_2S для потенціювання нефропротекторних властивостей метформіну.

ВИСНОВКИ

За умов експериментального діабету застосування метформіну виявляло антиоксидантну (рівень МДА та КГП зменшувався на 24,7–27,4 %, $p < 0,001$), протизапальну (рівень IL-1 β знижувався на 25,3 %, $p < 0,001$), антиапоптотичну (рівень каспази-3 зни-

жувався на 36,1 %, $p < 0,001$) та антифіброгенну (рівень галектину знижувався на 48,4 %, $p < 0,001$) дії у нирках, що асоціювалось зі збільшенням на 27,9 % рівня H_2S ($|r_s| = 0,59-0,75$, $p < 0,01$).

Використання модуляторів обміну H_2S модифікувало нефропротекторні властивості метформіну за ЦД. Введення донора гідроген сульфідів $NaHS$

потенціювало захисний вплив метформіну на нирки: рівні галектину-3, каспази-3, $IL-1\beta$, МДА та КГП у нирках були вірогідно меншими відповідно на 18–37 % ($p < 0,001$), ніж у тварин, які отримували лише метформін. Разом з тим, використання інгібітора синтезу гідроген сульфідів ППГ зменшувало ренопротективну активність метформіну.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Long-term risks of kidney living donation: review and position paper by the ERA-EDTA DESCARTES working group / U. Maggiore, K. Budde, U. Heemann [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2017. – Vol. 32, No. 2. – P. 216–223. DOI: 10.1093/ndt/gfw429.
2. Diabetic Kidney Disease / R. Bonner, O. Albajrami, J. Hudspeth, A. Upadhyay // *Prim Care.* – 2020. – Vol. 47, No. 4. – P. 645–659. DOI: 10.1016/j.pop.2020.08.004.
3. Selby N. M. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines / N. M. Selby, M. W. Taal // *Diabetes Obes. Metab.* – 2020. – No. 22. – P. 3–15. DOI: 10.1111/dom.14007.
4. Beck K. F. The Pathophysiology of H_2S in Renal Glomerular Diseases / K. F. Beck, J. Pfeilschifter // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12, No. 2. DOI: 10.3390/biom12020207.
5. The roles of hydrogen sulfide in renal physiology and disease states / J. Feng, X. Lu, H. Li, S. Wang // *Ren. Fail.* – 2022. – Vol. 44, No. 1. – P. 1289–1308. DOI: 10.1080/0886022X.2022.2107936.
6. Hydrogen Sulfide: Recent Progression and Perspectives for the Treatment of Diabetic Nephropathy / H.J. Sun, Z.Y. Wu, L. Cao [et al.] // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, No. 15. DOI: 10.3390/molecules24152857.
7. Kawanami D. Significance of metformin use in diabetic kidney disease / D. Kawanami, Y. Takashi, M. Tanabe // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, No. 12. DOI: 10.3390/ijms21124239.
8. Metformin is associated with the inhibition of renal artery AT1R/ET-1/iNOS axis in a rat model of diabetic nephropathy with suppression of inflammation and oxidative stress and kidney injury / A. F. Dawood, A. Maarouf, N. M. Alzamil // *Biomedicines.* – 2022. – Vol. 10, No. 7. DOI: 10.3390/biomedicines10071644.
9. Hydrogen sulfide reduced renal tissue fibrosis by regulating autophagy in diabetic rats / L. Li, T. Xiao, F. Li [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2017. – Vol. 16, No. 2. – P. 1715–1722. DOI: 10.3892/mmr.2017.6813. Epub 2017 Jun 20.
10. Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats / R. A. Maheshwari, R. Balaraman, A. K. Sen, A.K. Seth // *Indian J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 46, No. 6. – P. 627–632. DOI: 10.4103/0253-7613.144924.
11. Hydrogen sulphide treatment prevents renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the expression of ICAM-1 and NF- κ B concentration in normotensive and hypertensive rats / S. F. Hashmi, H. A. Rathore, M. A. Sattar [et al.] // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11, No. 10. DOI: 10.3390/biom11101549.
12. Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs / B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi [et al.] // *Folia Med. Cracov.* – 2011. – Vol. 51, No. 1–4. – P. 29–35.
13. Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, M. Uchiyama // *Anal Biochem.* – 1978. – Vol. 86, No. 1. – P. 271–278. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
14. Пат. України на винахід №58110А, МПК 7 А61К35/16. Спосіб визначення карбонільних сполук в сироватці крові / С. В. Шевчук, О. О. Пентюк, Р. А. Мусін, Н. В. Заїчко; заявник та патентовласник Український державний НДІ реабілітації інвалідів МОЗ України. – № 2002107890; заявл. 04.10.2002; опубл. 15.07.2003; Бюл. № 7. – 2 с.
15. Байляк М. М. Участь каталази і супероксиддисмутази у відповіді *Saccharomycetes cerevisiae* на дію пероксиду водню в експоненційній фазі росту / М. М. Байляк, Г. М. Семчишин, В. І. Луцзяк // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – Т. 78, № 2. – С. 79–85.
16. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats / T. Fukui, N. Ishizaka, S. Rajagopalan [et al.] // *Circ. Res.* – 1997. – Vol. 80, No. 1. – P. 45–51.
17. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // *The Journal of biological chemistry.* – 1951. – Vol. 193, No. 1. – P. 265–275. URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf).
18. Song A. Mechanism and application of metformin in kidney diseases: An update. / A. Song, C. Zhang, X. Meng // *Biomed Pharmacother.* – 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111454.
19. Metformin regulates inflammation and fibrosis in diabetic kidney disease through TNC/TLR4/NF- κ B/miR-155-5p inflammatory loop / Y. Zhou, X. Y. Ma, J. Y. Han [et al.] // *World J Diabetes.* – 2021. – Vol. 12, No. 1. – P. 19–46. DOI: 10.4239/wjd.v12.i1.19.
20. Role of oxidative stress and reduced endogenous hydrogen sulfide in diabetic nephropathy / A. Hussain Lodhi,

F. U. Ahmad, K. Furwa, A. Madni // Drug Des. Devel. Ther. – 2021. – No. 15. – P. 1031–1043.
DOI: 10.2147/DDDT.S291591.

21. Zhang H. Protective effect of hydrogen sulfide on the kidney (Review) / H. Zhang, H. Zhao, N. Guo // Mol. Med. Rep. – 2021. – Vol. 24, No. 4. DOI: 10.3892/mmr.2021.12335

REFERENCES

1. Maggiore U, Budde K, Heemann U, Hilbrands L, Oberbauer R, Oniscu GC. ... Abramowicz D. Long-term risks of kidney living donation: review and position paper by the ERA-EDTA DESCARTES working group. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(2): 216-23. DOI: 10.1093/ndt/gfw429.
2. Bonner R, Albajrami O, Hudspeth J, Upadhyay A. Diabetic kidney disease. *Prim Care.* 2020;47(4): 645-59. DOI: 10.1016/j.pop.2020.08.004.
3. Selby NM, & Taal MW. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. *Diabetes Obes Metab.* 2020;22: 3-15. DOI: 10.1111/dom.14007.
4. Beck KF, & Pfeilschifter J. The Pathophysiology of H₂S in Renal Glomerular Diseases. *Biomolecules.* 2022;12(2). DOI: 10.3390/biom12020207.
5. Feng J, Lu X, Li H, & Wang S. The roles of hydrogen sulfide in renal physiology and disease states. *Ren Fail.* 2022;44(1): 1289-08. DOI: 10.1080/0886022X.2022.2107936.
6. Sun HJ, Wu ZY, Cao L, Zhu MY, Liu TT. ... Bian JS. Hydrogen sulfide: Recent progression and perspectives for the treatment of diabetic nephropathy. *Molecules.* 2019;24(15). DOI: 10.3390/molecules24152857.
7. Kawanami D, Takashi Y, & Tanabe M. Significance of metformin use in diabetic kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12). DOI: 10.3390/ijms21124239.
8. Dawood AF, Maarouf A, Alzamil NM, Momenah MA, Shati AA, Bayoumy NM. ... Al-Ani B. Metformin is associated with the inhibition of renal artery AT1R/ET-1/iNOS axis in a rat model of diabetic nephropathy with suppression of inflammation and oxidative stress and kidney injury. *Biomedicines.* 2022;10(7). DOI: 10.3390/biomedicines10071644.
9. Li L, Xiao T, Li F, Li Y, Zeng O ... Yang J. Hydrogen sulfide reduced renal tissue fibrosis by regulating autophagy in diabetic rats. *Mol Med Rep.* 2017;16(2): 1715-22. DOI: 10.3892/mmr.2017.6813. Epub 2017 Jun 20.
10. Maheshwari RA, Balaraman R, Sen AK, & Seth AK. Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats. *Indian J Pharmacol.* 2014;46(6):627-32. DOI: 10.4103/0253-7613.144924.
11. Hashmi SF, Rathore HA, Sattar MA, Johns EJ, Gan CY, Chia TY, & Ahmad A. Hydrogen sulphide treatment prevents renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the expression of ICAM-1 and NF-κB concentration in normotensive and hypertensive rats. *Biomolecules.* 2021; 11(10). DOI: 10.3390/biom11101549.
12. Wiliński B, Wiliński J, Somogyi E, Piotrowska J & Góralaska M. Amlodipine affects endogenous hydrogen sul-

22. Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced NADPH oxidase 4 expression and matrix increase by recruiting inducible nitric oxide synthase in kidney proximal tubular epithelial cells / H. J. Lee, D. Y. Lee, M. M. Mariappan [et al.] // J. Biol. Chem. – 2017. – Vol. 292, No. 14. – P. 5665–5675. DOI: 10.1074/jbc.M116.766758.

fide tissue concentrations in different mouse organs. *Folia Med Cracov.* 2011;51(1-4):29-35.

13. Mihara M, & Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86(1): 271-8. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.

14. Shevchuk SV, Pentiuk OO, Musin RA, Zaichko NV. Method for assaying carbonyl substances in blood serum proteins (Patents of Ukraine for utility models No. 58110 A). 2003; State intellectual property service of Ukraine. URL: <https://base.uipv.org/search/INV/search.php?action=viewde tails&IdClaim=75674>. [in Ukrainian].

15. Baylyak MM, Semchyshyn HM, Lushchak VI. Role of catalase and superoxide dismutase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* response to hydrogen peroxide in exponential phase. *Ukrainian Biochemical Journal.* 2006;78(2): 79-85 [in Ukrainian].

16. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q 4th ... Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.* 1997;80(1): 45-51. DOI: 10.1161/01.res.80.1.45.

17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry.* 1951;193(1): 265-75. URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf).

18. Song A, Zhang C, & Meng X. Mechanism and application of metformin in kidney diseases: An update. *Biomed Pharmacother.* 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111454.

19. Zhou Y, Ma XY, Han JY, Yang M, Lv C, Shao Y ... Wang QY. Metformin regulates inflammation and fibrosis in diabetic kidney disease through TNC/TLR4/NF-κB/miR-155-5p inflammatory loop. *World J Diabetes.* 2021;12(1): 19-46. DOI: 10.4239/wjd.v12.i1.19.

20. Hussain Lodhi A, Ahmad FU, Furwa K, & Madni A. Role of Oxidative Stress and Reduced Endogenous Hydrogen Sulfide in Diabetic Nephropathy. *Drug Des Devel.* 2021;15: 1031-43. DOI: 10.2147/DDDT.S291591.

21. Zhang H, Zhao H, & Guo N. Protective effect of hydrogen sulfide on the kidney (Review). *Mol Med Rep.* 2021;24(4). DOI: 10.3892/mmr.2021.12335.

22. Lee HJ, Lee DY, Mariappan MM, Feliers D, Ghosh-Choudhury G, Abboud HE ... Kasinath BS. Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced NADPH oxidase 4 expression and matrix increase by recruiting inducible nitric oxide synthase in kidney proximal tubular epithelial cells. *J Biol Chem.* 2017;292(14): 5665-75. DOI: 10.1074/jbc.M116.766758.