

О. Б. Струтинська, А. В. Мельник

## Роль модуляторів обміну гідроген сульфід у модифікації нефропротекторної дії метформіну за стрептозотоцин-індукованого діабету

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

*Ключові слова:* стрептозотоцин-індукований діабет, нефропротекторна дія, метформін, гідроген сульфід

Діабетична нефропатія є актуальною медико-соціальною проблемою через її поширеність, швидкий розвиток серцево-судинних ускладнень і термінальної ниркової недостатності, що асоціюється зі значною інвалідизацією та смертністю пацієнтів [1]. Важливим питанням сьогодення є пошук лікарських препаратів, що можуть не лише ефективно контролювати рівень глікемії, але й виявляти ренопротективні властивості, зменшувати прогресування хронічної хвороби нирок, ризик розвитку кардіоваскулярних ускладнень і знижувати смертність пацієнтів.

Сьогодні препаратом першої лінії в лікуванні цукрового діабету (ЦД) 2 типу є цукрознижуючий засіб з групи бігуанідів метформін [2]. У масштабному проспективному дослідженні (The United Kingdom Prospective Diabetes Study) показано, що тривале використання метформіну в пацієнтів з ЦД 2 типу супроводжується зменшенням ризику розвитку інфаркту міокарда (на 33 %), інсульту (на 20 %) та мікрovasкулярних ускладнень, у тому числі ниркової недостатності (на 16 %) [3]. У пацієнтів з хронічною хворобою нирок та ЦД 2 типу метформін досить добре контролює рівень глікемії, швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) та мікроальбумінурію [1, 4]. У багатьох проспективних клі-

нічних дослідженнях застосування метформіну в пацієнтів з діабетичною нефропатією асоціювалось зі зниженням загальної та кардіоваскулярної смертності, ризику серцево-судинних ускладнень і розвитку термінальної ниркової недостатності [5–8].

Перспективним напрямом досліджень є оптимізація фармакотерапії діабетичної нефропатії метформіном на основі вивчення нових механізмів ренопротективної дії цього препарату. Останнім часом активно вивчається вплив сигнальної молекули гідроген сульфід ( $H_2S$ ) на функціонування нирок за ЦД [9]. Встановлено, що використання донорів  $H_2S$  (натрію гідроген сульфід ( $NaHS$ ), пропаргілцистеїну), покращує функціональний стан нирок за експериментального діабету – зменшує мікроальбумінурію, ретенційну азотемію, посилює фільтраційну функцію нирок, зменшує гіперактивацію ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) [10–12]. Однак залишається невивченим питання щодо причетності системи  $H_2S$  до реалізації нефропротекторної активності метформіну.

*Мета дослідження* – вивчити вплив модуляторів обміну  $H_2S$  ( $NaHS$  та пропаргілгліцину) на індуковані метформіном зміни функціонального стану нирок за експериментального ЦД.

**Матеріали та методи.** Досліди проведені на 75 білих нелінійних щурах-самцях масою тіла 180–200 г. Усіх лабораторних тварин утримували на стандартному харчовому раціоні віварію Вінницького національного

медичного університету ім. М. І. Пирогова за звичайного світлового й температурного режиму. Усі етапи досліджень виконані відповідно до рекомендацій «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) і вимог Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». У ході експерименту всі піддослідні тварини поділені на п'ять груп (по 15 щурів у кожній). Перша група – контрольна, тварини отримували одноразово інтраперитонеально (і/п) 0,1 моль/л цитратний буфер рН 4,5 (0,1 мл/100 г маси). У другої, третьої, четвертої та п'ятої груп тварин моделювали ЦД шляхом одноразового і/п введення свіжоприготовленого розчину стрептозотоцину (СТЦ) (Sigma, США) на 0,1 моль/л цитратному буфері (рН 4,5) у дозі 40 мг/кг маси щура. У такій дозі СТЦ викликав стійку гіперглікемію [13]. Через 72 год після ін'єкції СТЦ визначали рівень глюкози в периферичній крові, й для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії понад 16,7 ммоль/л. З 3 по 28 добу щурам третьої, четвертої та п'ятої груп вводили інтрагастрально метформін (Берлін-Хемі, Німеччина) у дозі 500 мг/кг 1 раз на добу на 1 % крохмальному гелі (з розрахунку 1 мл на 100 г маси тіла). Щурам 4 групи крім метформіну вводили також донор  $H_2S$  –  $NaHS \cdot H_2O$  (Sigma, США) у дозі 56 мкмоль/кг 1 раз на добу і/п; щурам 5 групи вводили метформін та інгібітор синтезу  $H_2S$  – D,L-пропаргілліцин (ППГ) (Sigma, США) у дозі 442 мкмоль/кг (50 мг/кг) маси 1 раз на добу і/п. Дози та шляхи введення метформіну,  $NaHS$  і ППГ були запозичені з даних літератури, що отримані за проведення подібних експериментальних досліджень [14, 15].

Біохімічні дослідження виконані на базі кафедри біологічної та загальної хімії та науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про атестацію № 04915). Усі засоби вимірювальної техніки, які використовували в дослідженні, підлягали метрологічному контролю. Тварин знеживлювали методом декапітації під пропофоловим наркозом (60 мг/кг і/п, Fresenius Kabi).

Для досліджень використовували периферичну кров з хвостової вени, сироватку крові, сечу та пост'ядерний супернатант гомогенату нирок. Периферичну кров отримували з кінчика хвоста шляхом нанесення поверхневих насічок з використанням скарифікатора. Цільну кров отримували під час декапітації тварин, сироватку крові – центрифугуванням цільної венозної крові при 1500 об/хв протягом 20 хв. Аліквоти сироватки відбирали в мікропробірці Ерндорф і зберігали при  $-20$  °C до моменту проведення аналізу. Для отримання сечі за 1 добу до закінчення дослідження тваринам проводили «водне навантаження» шляхом інтрагастрального введення питної води з розрахунку 1 мл на 100 г маси тіла, розміщували в спеціальних обмінних клітках і збирали сечу за 6 год. Сечу ретельно перемішували, центрифугували (1500 g 15 хв), аліквоти відбирали в мікропробірці типу Ерндорф і зберігали при  $-20$  °C до проведення дослідження.

Із метою оцінки рівня  $H_2S$  нирки занурювали в холодний 1,15 % розчин KCl, подрібнювали та гомогенізували в середовищі 0,01 моль/л NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). До 1 мл отриманого гомогенату додавали 0,25 мл 50 % трихлороцтової кислоти, центрифугували при 1200 g 15 хв

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

Вміст глюкози визначали в периферичній крові щурів з використанням глюкометра Accu-Chek Active (Rouche Group, Німеччина). Вміст  $H_2S$  оцінювали в супернатанті гомогенату нирок спектрофотометричним методом за реакцією утворення метиленового синього в присутності  $N,N$ -диметил-парафенілендіаміну та  $FeCl_3$  [16]. Рівень креатиніну в сечі та сироватці крові визначали спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією Яффе (з пікриновою кислотою) з використанням стандартних наборів відповідно до інструкції виробника (Філісіт-Діагностика, Україна). Кліренс креатиніну (мл/хв) розраховували за формулою:

$$\text{Кліренс креатиніну} = \frac{C(\text{креатинін сечі}) \cdot XД \cdot 1000}{C(\text{креатинін крові})},$$

де  $C$  (креатинін сечі) – вміст креатиніну в сечі, ммоль/л;  $XД$  – хвилиний діурез, мл/хв;  $C$  (креатинін крові) – вміст креатиніну в сироватці крові, мкмоль/л; 1000 – коефіцієнт перерахунку ммоль/л у мкмоль/л.

Відносну реабсорбцію води (ВР води, %) розраховували за формулою:

$$\text{ВР}_{\text{води}} = \frac{\text{Кліренс креатиніну} - XД}{C(\text{креатинін крові})} \cdot 1000.$$

Вміст білка в сечі визначали за методом Лоурі [17]. Вміст йонів натрію та калію в сечі визначали спектрофотометричним методом з використанням стандартного набору фірми Філісіт-Діагностика, Україна. Рівень альдостерону в крові оцінювали імуноферментним методом з використанням відповідного комерційного набору «ALD (Aldosterone) ELISA Kit» (Elabscience Biotechnology Inc., США) відповідно до інструкції фірми-виробника. Детекцію проводили на аналізаторі STAT-FAX 303+ (США) при  $\lambda = 450$  нм (диференційний фільтр – 630 нм).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми SPSS Statistica 17.0. Результати наводили у вигляді середнього арифметичного та середньої помилки середнього ( $M \pm m$ ). Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Колмогорова-Смірнова. Достовірність різниці між показниками визначали залежно від типу розподілу: за нормального розподілу – за параметричним  $t$ -критерієм Стьюдента, у разі відхилення від нормального – за непараметричним  $U$ -критерієм Манна-Уїтні. Зв'язок між показниками визначали за допомогою кореляційного аналізу за Спірманом. Вірогідною вважали різницю в разі  $p < 0,05$  [18].

**Результати та їх обговорення.** Дослідження вмісту  $H_2S$  у нирках щурів (рисунок) показало, що за стрептозотоцин-індукованого діабету (СТЦ-діабету) відмічається зменшення його рівня на 33,2 % ( $p < 0,001$ ) порівняно з контролем. За умов застосування метформіну рівень  $H_2S$  у нирках на 27,9 % ( $p < 0,001$ ) перевищував показник нелікованих тварин. Використання донору  $H_2S$  –  $NaHS$  потенціювало коригуючий вплив метформіну на вміст  $H_2S$  у нирках: його рівень на 13,5 % перевищував

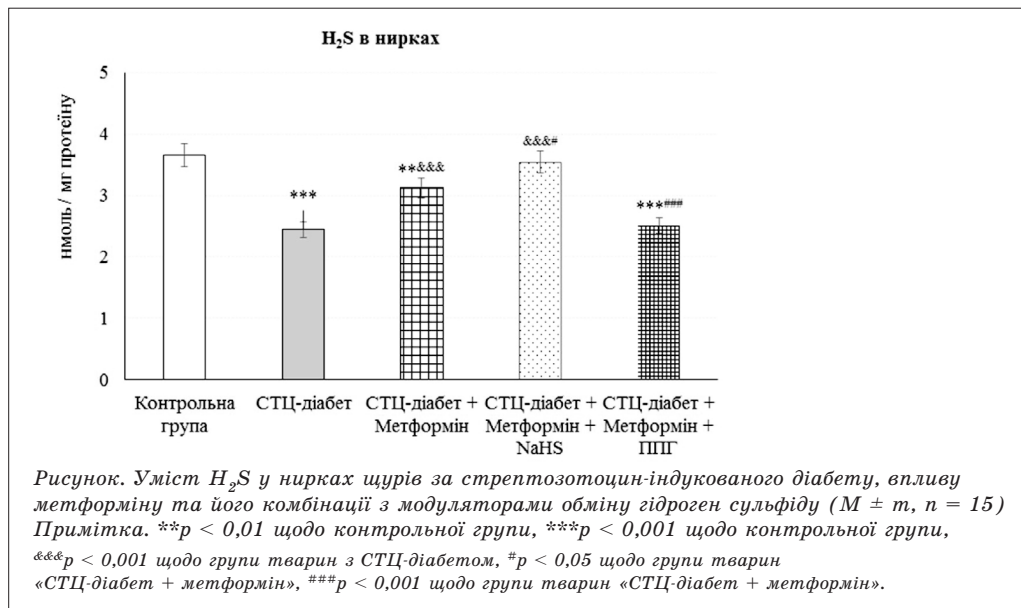
показник тварин, лікованих лише метформіном. Натомість на тлі введення ППГ здатність метформіну відновлювати запаси  $H_2S$  у нирках була вірогідно меншою: рівень  $H_2S$  на 19,5 % поступався такому в групі щурів «СТЦ-діабет + метформін».

Дослідження показників функціонування нирок (табл. 1) показало, що станом на 28 добу після одноразового введення СТЦ реєструвались поліурія (діурез зростав у 1,72 разу,  $p < 0,001$  порівняно з контролем), ретенційна азотемія (креатинін сироватки крові збільшувався в 2,6 разу,  $p < 0,001$ ), протеїнурія (екскреція білка з сечею зростала в 2,4 разу,  $p < 0,001$ ), зменшення фільтраційної здатності нирок (кліренс креатиніну зменшувався на 23,1 %,  $p < 0,001$ ) та реабсорбції води (показник відносної реабсорбції знижувався на 3,17 %,  $p < 0,001$ ). Введення метформіну за СТЦ-діабету супроводжувалось вірогідно меншим порушенням функціонування нирок: діурез, сироватковий вміст креатиніну та протеїнурія були вірогідно меншими відповідно на 41,0; 64,3 та 76,5 % ( $p < 0,001$ ), а кліренс креатиніну та відносна реабсорбція води –

більшими на 13,1 та 1,66 % ( $p < 0,05$ ) відносно нелікованих тварин.

Застосування модуляторів обміну гідроген сульфідом призводило до модифікації ренопротективної дії метформіну за СТЦ-діабету. Так, NaHS посилював захисну дію метформіну щодо нирок, тоді як ППГ виявляв протилежний ефект. У групі тварин «СТЦ-діабет + метформін + NaHS» показник діурезу, сироватковий вміст креатиніну й екскреція білка з сечею були вірогідно меншими відповідно на 19,5; 30,0 та 21,2 % ( $p < 0,001$ ), а кліренс креатиніну та відносна реабсорбція води – більшими на 14,3 та 1,23 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з показниками тварин, яких лікували лише метформіном. Натомість у щурів, які отримували метформін у комбінації з ППГ, показник діурезу, сироватковий вміст креатиніну та протеїнурія були вірогідно більшими відповідно на 14,3; 32,7 та 18,0 % ( $p < 0,01$ ), а кліренс креатиніну та відносна реабсорбція води – меншими на 11,1 та 1,21 % ( $p < 0,01$ ), порівняно з тваринами, яких лікували лише метформіном.

Дослідження особливостей іонорегуляторної функції нирок (табл. 2)



виявило, що СТЦ-діабет викликає зростання в сироватці крові вмісту альдостерону (у 2 рази,  $p < 0,001$ ), що супроводжується зменшенням натрійурезу (на 39,1 %,  $p < 0,001$ ), збільшенням екскреції іонів калію з сечею (на 20,3 %,  $p < 0,001$ ) та зменшенням співвідношення  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  сечі (на 49,4 %,  $p < 0,001$ ) порівняно з контролем. Застосування метформіну значною мірою попереджує ініційовані СТЦ порушення секреції альдостерону та іонорегуляторної функції нирок. За цих умов відмічається зниження сироваткового рівня альдостерону та екскреції калію з сечею відповідно на 18,1 та 7,51 % ( $p < 0,001$ ), а також збільшення натрійурезу й співвідношення  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  сечі на 18,6 та 28,4 % ( $p < 0,001$ ) порівняно з нелікованими тваринами.

Застосування модуляторів обміну  $\text{H}_2\text{S}$  чинить різноспрямований вплив на іонорегуляторну функцію нирок і секрецію альдостерону. У групі тварин «СТЦ-діабет + метформін +  $\text{NaHS}$ » вміст альдостерону в сироватці крові, екскреція калію з сечею вірогідно менші відповідно на 24,2 та 10,7 % ( $p < 0,001$ ), а натрійурез та співвідношення  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  сечі більші на 16,3 та 30,1 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками тварин, які отримували лише метформін. За умов введення ППГ вказані показники наближались до таких у тварин з СТЦ-діабетом без лікування: рівень альдостерону в сироватці крові, екскреція калію з сечею вірогідно більші відповідно на 13,6 та 10,4 %, а натрійурез та співвідношення  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  сечі менші на 16,9 та 24,6 % ( $p < 0,01$ ), ніж у тварин, які отримували лікування метформіном.

Проведені дослідження засвідчили, що СТЦ-діабет супроводжується розвитком дефіциту  $\text{H}_2\text{S}$  у нирках, порушенням функціонального стану нирок (поліурією, ретенційною азотемією, протеїнурією, зниженням клу-

бочкової фільтрації та реабсорбції води), збільшенням секреції альдостерону та розладами іонорегуляторної функції нирок (зниженням натрійурезу, збільшенням екскреції калію з сечею). За цих умов використання метформіну збільшує запаси  $\text{H}_2\text{S}$  у нирках, покращує функцію тубулярного та гломерулярного апаратів нирок (знижується поліурія, ретенційна азотемія, протеїнурія та збільшуються клубочкова фільтрація та реабсорбція води), зменшує секрецію альдостерону та порушення балансу електролітів. У літературі знайдено підтвердження того, що метформін за експериментального ЦД зменшує дисфункцію тубулярного та гломерулярного апаратів нирок, відновлює натрійурез (зменшує активність  $\text{Na-Cl}$ -котранспортера), а також зменшує секрецію альдостерону через зниження експресії в нирках рецепторів I типу до ангіотензину II [19–21]. Виникає питання щодо залученості системи  $\text{H}_2\text{S}$  у нирках до нефропротекторного потенціалу метформіну. Для цього спершу було проведено кореляційний аналіз і встановлено, що у тварин, яких лікували метформіном, між рівнем  $\text{H}_2\text{S}$  у нирках і показниками діурезу, рівня креатиніну в сироватці крові, протеїнурії, екскреції калію з сечею та сироватковим вмістом альдостерону виникали достовірні обернені асоціації ( $r_s = - (0,37-0,66)$ ,  $p < 0,05$ ), тоді як з кліренсом креатиніну, відносною реабсорбцією води, натрійурезом – вірогідні прямі зв'язки ( $r_s = 0,54-0,73$ ,  $p < 0,01$ ). Отримані результати надають додаткові докази причетності  $\text{H}_2\text{S}$  до нефропротекторної дії метформіну за ЦД. Тому згодом оцінили внесок сигнальної системи  $\text{H}_2\text{S}$  у забезпеченні ренопротективного потенціалу метформіну. З'ясувалось, що використання донора  $\text{H}_2\text{S}$  –  $\text{NaHS}$  потенціє коригуючий



Таблиця 1

Показники функціонування нирок у щурів за стрептозотозин-індукованого діабету, впливу метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфідом ( $M \pm m, n = 15$ )

Група тварин	Діурез, мл/6 год	Креатинін сироватки, мкмоль/л	Кліренс креатиніну, мл/хв	Відносна реабсорбція води, %	Білок сечі, мг/6 год
Контрольна група	5,76 ± 0,14	91,3 ± 2,45	0,488 ± 0,016	97,50 ± 0,06	0,912 ± 0,010
Стрептозотозин-індукований діабет	9,88 ± 0,19***	235,0 ± 2,99***	0,375 ± 0,016***	94,40 ± 0,14***	2,15 ± 0,10***
Стрептозотозин-індукований діабет + метформін	8,12 ± 0,22***, &&&	150,0 ± 3,27***, &&&	0,424 ± 0,012 <sup>†</sup> , &&&	96,0 ± 0,07***, &&&	1,61 ± 0,11***, &&&
Стрептозотозин-індукований діабет + метформін + натрію гідроген сульфід	6,54 ± 0,18 <sup>**</sup> , &&&, ###	105,0 ± 3,05 <sup>**</sup> , &&&, ###	0,485 ± 0,014 &&&, ##	97,20 ± 0,05 &&&, ###	1,27 ± 0,09***, &&&, #
Стрептозотозин-індукований діабет + метформін + пропаргиллцін	9,28 ± 0,20***, &, ###	199,0 ± 3,25***, &&&, ###	0,377 ± 0,013***, #	94,80 ± 0,10 <sup>***</sup> , &, ###	1,90 ± 0,008***, &, #

Примітка. Тут і в табл. 2: \*статистично вірогідні відмінності щодо показника контролюваної групи (\* $r < 0,05$ , \*\* $r < 0,01$ , \*\*\* $r < 0,001$ ), †статистично вірогідні відмінності щодо показника в групі тварин з СТЦ-діабетом († $r < 0,05$ , †† $r < 0,01$ , ††† $r < 0,001$ ), #статистично вірогідні відмінності щодо показника в групі тварин «СТЦ-діабет + метформін» (# $r < 0,05$ , ## $r < 0,01$ , ### $r < 0,001$ ).

Показники іонорегуляторної функції нирок у щурів за стрептозотонин-індукованого діабету, впливу метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфідом ( $M \pm m, n = 15$ )

Група тварин	Na <sup>+</sup> сечі, мкмоль/6 год	K <sup>+</sup> сечі, мкмоль/6 год	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> сечі	Альдостерон сироватки крові, пг/мл
Контрольна група	2,30 ± 0,11	35,40 ± 0,58	0,065 ± 0,002	210,0 ± 3,99
Стрептозотонин-індукований діабет	1,40 ± 0,07***	42,60 ± 0,60***	0,033 ± 0,001***	430,0 ± 5,37***
Стрептозотонин-індукований діабет + метформін	1,66 ± 0,09*,&&&	39,40 ± 0,50***,&&&	0,042 ± 0,002***,&&&	352,0 ± 6,66***,&&&
Стрептозотонин-індукований діабет + метформін + натрію гідрогенсульфід	1,93 ± 0,08*,&&&,#	35,20 ± 0,44&&&,&&&###	0,055 ± 0,002***,&&&###	267,0 ± 5,91***,&&&###
Стрептозотонин-індукований діабет + метформін + пропаргільгліцин	1,38 ± 0,05***,#	43,50 ± 0,55***,###	0,032 ± 0,001***,###	400,0 ± 6,87***,&&###

вплив метформіну на функціональний стан нирок, іонорегуляторну функцію нирок, тоді як введення інгібітора синтезу  $H_2S$  – ППГ вірогідно зменшує нефропротекторні властивості метформіну за СТЦ-діабету. Проведені дослідження надають беззаперечні докази участі  $H_2S$  у механізмах захисної дії метформіну на нирки. Виникає питання щодо молекулярних механізмів, через які реалізується вплив системи  $H_2S$  на функціонування нирок, участь у регуляції водно-електролітного обміну. За даними літератури,  $NaHS$  через активацію  $K^+_{ATP}$ -каналів приносить артеріол нирок посилює нирковий кровотік, збільшує швидкість клубочкової фільтрації та азотовидільну функцію нирок [11, 12, 22]. Поряд з цим донори  $H_2S$  стимулюють екскрецію натрію з сечею шляхом зниження активності  $Na-K-2Cl$ -ко-транспортеру,  $Na$ ,  $K$ -АТФази та  $Na$ -каналів, залежних від фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату [9, 22]. Також відомо, що  $H_2S$  зменшує активність РААС через різноманітні молекулярні механізми: 1) знижує активність аденілатциклази та рівень цАМФ, що спричиняє зменшення секреції реніну; 2) інгібує активність ангіотензинперетворюючого ферменту, адже перешкоджає входу цинку в його активний центр; 3) інгібує зв'язування ангіотензину II з рецепторами I типу [23].

За результатами проведеного дослідження встановлено, що нефропротекторна активність метформіну опосе-

редковується через вплив на сигнальну систему  $H_2S$ , а використання донорів  $H_2S$  потенціює захисний вплив метформіну на нирки за експериментального ЦД і є перспективним для проведення подальших досліджень.

## Висновки

1. Застосування метформіну за СТЦ-діабету викликало збільшення рівня  $H_2S$  у нирках (на 27,9 %,  $p < 0,001$ ), що супроводжувалось зменшенням гломерулярних і тубулярних порушень (збільшувався кліренс креатиніну на 13,1 %,  $p < 0,05$ , знижувалась протеїнурія на 25,1 %,  $p < 0,001$ , вірогідно зростав відносний показник реабсорбція води), зниженням секреції альдостерону (на 18,1 %,  $p < 0,001$ ) та збільшенням натрійурезу (на 18,6 %,  $p < 0,05$ ).
2. Введення модуляторів обміну  $H_2S$  модифікувало нефропротекторну дію метформіну за СТЦ-діабету: застосування  $NaHS$  посилювало коригуючий вплив метформіну на функціонування нирок (зростав кліренс креатиніну на 14,3 %,  $p < 0,01$ , зменшувалась протеїнурія на 21,2 %,  $p < 0,05$ , знижувався рівень альдостерону в крові на 24,2 %,  $p < 0,001$  та зростала екскреція натрію з сечею на 16,3 %,  $p < 0,05$ ), тоді як введення ППГ спричиняло протилежний ефект (зменшувались кліренс креатиніну та натрійурез на 11,1–16,9 %,  $p < 0,01$ , а також зростала протеїнурія та рівень альдостерону в крові на 13,6–18,0 %,  $p < 0,05$ ).

1. Kawanami D., Takashi Y., Tanabe M. Significance of metformin use in diabetic kidney disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124239>.
2. Метформін у лікуванні цукрового діабету 2-го типу: у фокусі уваги – клінічні аспекти. М. В. Влащенко, Н. В. Кучевська, Ю. О. Кривов'яз, Т. В. Секрет. *Практикуючий лікар.* 2016. Т. 3 (5). С. 26–30. <https://plr.com.ua/index.php/journal/article/view/151>.
3. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. R. R. Holman, M. A. Paul, S. K. Bethel et al. *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. P. 1577–1589. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0806470>.
4. Mariano F., Biancone L. Metformin, chronic nephropathy and lactic acidosis: a multi-faceted issue for the nephrologist. *J. Nephro.* 2021. V. 34 (4). P. 1127–1135. <https://doi.org/10.1007/s40620-020-00941-8>.
5. Metformin use and cardiovascular events in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. D. M. Charytan, S. D. Solomon, P. Ivanovich et al. *Diabetes Obes. Metab.* 2019. V. 21. P. 1199–1208. <https://doi.org/10.1111/dom.13642>.



6. The long-term effects of metformin on patients with type 2 diabetic kidney disease. S. Kwon, Y. C. Kim, J. Y. Park et al. *Diabetes Care*. 2020. V. 43. P. 948–955. <https://doi.org/10.2337/dc19-0936>.
7. Mortality associated with metformin versus sulfonylurea initiation: a cohort study of veterans with diabetes and chronic kidney disease. Z. A. Marcum, C. W. Forsberg, K. P. Moore et al. *J. Gen. Intern. Med.* 2018. V. 33. P. 155–165. <https://doi.org/10.1007/s11606-017-4219-3>.
8. Metformin treatment in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease stages 3A, 3B, or 4. J. D. Lalau, F. Kajbaf, Y. Bennis et al. *Diabetes Care*. 2018. V. 41. P. 547–553. <https://doi.org/10.2337/dc17-2231>.
9. Hydrogen sulfide: recent progression and perspectives for the treatment of diabetic nephropathy. H. J. Sun, Z. Y. Wu, L. Cao et al. *Molecules*. 2019. V. 24 (15). <https://doi.org/10.3390/molecules24152857>.
10. Novel hydrogen sulfide-releasing compound, S-propargyl-cysteine, prevents STZ-induced diabetic nephropathy. X. Qian, X. Li, F. Ma et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 473. P. 931–938. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.154>.
11. Protective effect of hydrogen sulfide on kidneys of type 1 diabetic rats. R. Yang, X. F. Liu, S. F. Ma et al. *Chin. J. Appl. Physiol.* 2016. V. 32. P. 181–184. <https://doi.org/10.13459/j.cnki.cjap.2016.02.023>.
12. Hydrogen sulfide attenuates renin angiotensin and aldosterone pathological signaling to preserve kidney function and improve exercise tolerance in heart failure. Z. Li, C. L. Organ, J. Kang et al. *JACC Basic Transl.* 2018. V. 3. P. 796–809. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.08.011>.
13. Hydrogen sulfide reduced renal tissue fibrosis by regulating autophagy in diabetic rats. L. Li, T. Xiao, F. Li et al. *Mol. Med. Rep.* 2017. V. 16 (2). P. 1715–1722. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6813>. Epub 2017 Jun 20.
14. Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats. R. A. Maheshwari, R. A. Balaraman, K. Sen, A. K. Seth. *Indian J. Pharmacol.* 2014. V. 46 (6). P. 627–632. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.144924>.
15. Hydrogen sulphide treatment prevents renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the expression of ICAM-1 and NF-κB concentration in normotensive and hypertensive rats. S. F. Hashmi, H. A. Rathore, M. A. Sattar et al. *Biomolecules*. 2021. V. 11 (10). <https://doi.org/10.3390/biom11101549>.
16. Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs. B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi et al. *Folia Med. Cracov.* 2011. V. 51 (1–4). P. 29–35.
17. Protein measurement with the Folin phenol reagent. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. *The Journal of biological chemistry*. 1951. V. 193 (1). P. 265–275. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf).
18. Біостатистика: підручник; за заг. ред. Т. С. Грузєвої. Т. С. Грузєва, В. М. Лехан, В. А. Огнев та ін. Вінниця : Нова Книга, 2020.
19. 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 et al. *Biomedicines*. 2022. V. 10 (7). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071644>.
20. Metformin increases urinary sodium excretion by reducing phosphorylation of the sodium-chloride cotransporter. H. Hashimoto, N. Nomura, W. Shoda et al. *Metabolism*. 2018. V. 85. P. 23–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.02.009>.
21. Deshmukh A., Manjalkar P. Synergistic effect of micronutrients and metformin in alleviating diabetic nephropathy and cardiovascular dysfunctioning in diabetic rat. *J. Diabetes Metab. Disord.* 2021. V. 20 (1). P. 533–541. <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00776-5>.
22. Zhang H., Zhao H., Guo N. Protective effect of hydrogen sulfide on the kidney (Review). *Mol. Med. Rep.* 2021. V. 24 (4). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12335>.
23. The roles of hydrogen sulfide in renal physiology and disease states. J. Feng, X. Lu, H. Li, S. Wang. *Ren. Fail.* 2022. V. 44 (1). P. 1289–1308. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2107936>.

**О. Б. Струтинська, А. В. Мельник**

### **Роль модуляторів обміну гідроген сульфіді в модифікації нефропротекторної дії метформіну за стрептозотоцин-індукованого діабету**

*Мета дослідження* – вивчити вплив модуляторів обміну гідроген сульфіді (H<sub>2</sub>S) (натрію гідроген сульфіді (NaHS) і пропаргілліцину (ППГ) на індуковані метформіном зміни функціонального стану нирок за експериментального цукрового діабету (ЦД).

Дослідження виконано на 75 білих нелінійних щурах-самцях масою тіла 150–240 г. Тварини були поділені на п'ять груп: 1 група – контроль; 2 група – тварини з експериментальним ЦД, який ініціювали одноразовим інтраперитонеальним введенням стрептозоточину (СТЦ) (40 мг/кг маси) на 0,1 моль/л у цитратному буфері (рН 4,5); 3 група – тварини з експериментальним ЦД, які з 3 по 28 добу отримували лікування метформіном (500 мг/кг/добу, інтрагастрально); 4 група – тварини з ЦД, які отримували метформін та NaHS (56 мкмоль/кг/добу, інтрагастрально); 5 група – тварини з ЦД, які отримували метформін та ППГ (442 мкмоль/кг/добу, інтрагастрально). У периферичній крові визначали вміст

глюкози, у сироватці крові – рівень креатиніну й альдостерону, у сечі – вміст креатиніну, натрію, калію та білка. Кліренс креатиніну та відносну реабсорбцію води розраховували за відомими формулами.

Виявилось, що застосування метформіну за СТЦ-діабету викликало збільшення рівня  $H_2S$  у нирках (на 27,9 %,  $p < 0,001$ ), що супроводжувалось зменшенням гломерулярних і тубулярних порушень (збільшувався кліренс креатиніну на 13,1 %,  $p < 0,05$ , знижувалась протеїнурія на 25,1 %,  $p < 0,001$ , вірогідно зростає відносний показник реабсорбції води), зменшенням вмісту альдостерону в крові (на 18,1 %,  $p < 0,05$ ) та збільшенням екскреції натрію з сечею (на 18,6 %,  $p < 0,05$ ).

Введення модюляторів обміну  $H_2S$  модифікувало нефропротекторну дію метформіну за СТЦ-діабету. Так, застосування NaHS посилювало коригуючий вплив метформіну на функціонування нирок – зростає кліренс креатиніну (на 14,3 %,  $p < 0,01$ ), зменшувалась протеїнурія (на 21,2 %,  $p < 0,05$ ), знижувався рівень альдостерону в крові (на 24,2 %,  $p < 0,001$ ) та зростала екскреція іонів натрію з сечею (на 16,3 %,  $p < 0,05$ ). У той самий час введення ППГ зменшувало нефропротективну активність метформіну – знижувались кліренс креатиніну та натрійурез (відповідно на 11,1 і 16,9 %,  $p < 0,01$ ), збільшувалися протеїнурія та вміст альдостерону в крові (відповідно на 13,6 і 18,0 %,  $p < 0,05$ ).

За результатами проведеного дослідження встановлено, що нефропротекторна активність метформіну опосередковується через вплив на сигнальну систему  $H_2S$ , а використання донорів  $H_2S$  потенціює захисний вплив метформіну на нирки за експериментального ЦД і є перспективним для проведення подальших досліджень.

*Ключові слова:* стрептозотозин-індукований діабет, нефропротекторна дія, метформін, гідроген сульфід

**O. B. Strutynska, A. V. Melnyk**

### **The role of modulators of hydrogen sulfide metabolism in modifying the nephroprotective effect of metformin in streptozotocin-induced diabetes**

*The aim of the study* – to investigate the effect of modulators of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) metabolism (NaHS and propargylglycine (PPG)) on metformin-induced changes in the functional state of the kidneys under experimental diabetes.

The study was performed on 75 white non-linear male rats with a body weight of 150–240 g. The animals were divided into five groups: group 1 – control; group 2 – animals with experimental diabetes, initiated by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 40 mg/kg of weight) in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5); group 3 – animals with experimental diabetes, treated with metformin (500 mg/kg/day, intragastrically) from the 3<sup>rd</sup> to the 28<sup>th</sup> day; group 4 – animals with diabetes mellitus, which, along with metformin, were administered NaHS (56  $\mu$ mol/kg/day, intragastrically); group 5 – animals with diabetes, which were administered PPG (442  $\mu$ mol/kg/day, intragastrically) along with metformin.

Glucose level was assessed in peripheral blood, creatinine and aldosterone levels in blood serum, and creatinine, sodium, potassium, and protein content in urine. Creatinine clearance and relative water reabsorption were calculated according to known formulas.

It was discovered that metformin use in STZ-diabetes caused an increase in the level of  $H_2S$  in the kidneys (by 27.9 %,  $p < 0.001$ ), which was accompanied by a decrease in glomerular and tubular disorders (creatinine clearance increased by 13.1 %,  $p < 0.05$ , proteinuria decreased by 25.1 %,  $p < 0.001$ , an indicator of relative water reabsorption probably increased), a decrease in aldosterone level (by 18.1 %,  $p < 0.05$ ) and an increase in urinary sodium excretion (by 18.6 %,  $p < 0.05$ ).

The administration of modulators of hydrogen sulfide metabolism modified the nephroprotective effect of metformin in STZ-diabetes. Thus, the administration of NaHS increased the corrective effect of metformin on kidney function – creatinine clearance increased (by 14.3 %,  $p < 0.01$ ), proteinuria decreased (by 21.2 %,  $p < 0.05$ ), and the level of aldosterone in the blood decreased (by 24.2 %,  $p < 0.001$ ) and urinary sodium excretion increased (by 16.3 %,  $p < 0.05$ ). In the meantime, PPG administration led to weakening of metformin nephroprotective activity – creatinine clearance and natriuresis decreased respectively by 11.1 and 16.9 %,  $p < 0.01$ , proteinuria and the level of aldosterone in the blood increased correspondingly by 13.6 and 18.0 %,  $p < 0.05$ .

Based on the results of the study, it was discovered that metformin nephroprotective activity is mediated through the effect on the  $H_2S$  signaling system, and the use of  $H_2S$  donors potentiates the protective effect of metformin on the kidneys under experimental STZ-diabetes and is promising for further research.

*Key words:* streptozotocin-induced diabetes, nephroprotective effect, metformin, hydrogen sulfide

Надійшла: 16 листопада 2022 р.

Прийнята до друку: 21 грудня 2022 р.

**Контактна особа:** Мельник Андрій Володимирович, доктор медичних наук, професор, кафедра біологічної та загальної хімії, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, буд. 56, вул. Пирогова, м. Вінниця, 21018. Тел.: + 38 0 93 670 27 08.  
Електронна пошта: anderneting@gmail.com