УДК 546.221.1:616.61:616.379-008.64:612.08
DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2022.i4.13565

О. Б. Струтинська, А. В. Мельник
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ М. І. ПИРОГОВА

ВПЛИВ МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЇ З МОДУЛЯТОРАМИ ОБМІНУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА РІВЕНЬ ГЛІКЕМІЇ І СТАН СИСТЕМИ H_2S У НИРКАХ ЩУРІВ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНОМУ ДІАБЕТІ

Вступ. *Діабетична нефропатія належить до тяжких мікросудинних ускладнень цукрового діабету (ЦД) і є однією з причин інвалідизації та смертності пацієнтів. Важливу роль в її лікуванні відіграє цукрознижувальний препарат "Метформін". Залишається нез'ясованим питання щодо молекулярних механізмів дії метформіну, зокрема про роль сигнальної системи гідроген сульфіду (H_2S) у його фармакологічній активності.*

Мета дослідження *– оцінити вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфіду на рівень глікемії і метаболізм H_2S у нирках щурів при стрептозотоциніндукованому діабеті.*

Методи дослідження. *Досліди проведено на 75 білих нелінійних щурах-самцях масою 150–240 г. Їх поділили на 5 груп: 1-ша – контрольна; 2-га – тварини з експериментальним ЦД, який ініціювали одноразовим інтраперитонеальним введенням стрептозотоцину (40 мг/кг маси) на 0,1 М цитратному буфері (pH 4,5); 3-тя – щури з експериментальним ЦД, які з 3-ї до 28-ї доби отримували лікування метформіном (500 мг/кг/добу, інтрагастрально); 4-та – тварини із ЦД, яким, крім метформіну, вводили NaHS (56 мкмоль/кг/добу, інтраперитонеально); 5-та – щури із ЦД, яким, крім метформіну, вводили пропаргілгліцин (442 мкмоль/кг/добу, інтраперитонеально). У периферичній крові визначали вміст глюкози, а в супернатанті гомогенату нирок оцінювали рівень H_2S, активність H_2S-синтезувальних ензимів (цистатіонін-γ-ліази – ЦГЛ, цистатіонін-β-синтази – ЦБС, цистеїнамінотрансферази/3-меркаптопіруватсульфуртрансферази – ЦАТ/3-МСТ), тіоредоксинредуктази (ТРР) та швидкість утилізації H_2S.*

Результати й обговорення. *Стрептозотоциніндукований діабет (СТЦ-діабет) викликав вірогідне зростання у крові рівня глюкози в 4,6 раза ($p<0,001$), зниження в нирках вмісту H_2S, активності H_2S-синтезувальних ензимів (ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ/3-МСТ), активності ТРР на 33,2–58,1 % ($p<0,001$), збільшення швидкості утилізації H_2S на 79,4 % ($p<0,001$) порівняно з показниками контрольної групи. Застосування метформіну при СТЦ-діабеті проявило гіпоглікемічну активність (рівень глюкози знизився на 25,2 %, $p<0,001$, порівняно з нелікованими тваринами), зменшило дефіцит H_2S у нирках (рівень H_2S зріс на 27,9 %, $p<0,001$), підвищило активність H_2S-синтезувальних ензимів і ТРР (на 15,2–60,0 %, $p<0,05$), а також зменшило швидкість утилізації H_2S (на 32,7 %, $p<0,001$). Введення донора H_2S – NaHS потенціювало гіпоглікемічну активність метформіну та його здатність коригувати обмін H_2S у нирках, тоді як введення інгібітора синтезу H_2S – пропаргілгліцину мало протилежний ефект при СТЦ-діабеті.*

Висновки. *При СТЦ-діабеті метформін проявляє гіпоглікемічну активність та коригує порушення метаболізму H_2S у нирках. Застосування NaHS посилює гіпоглікемічну активність метформіну і потенціює його вплив на систему H_2S у нирках, тоді як використання пропаргілгліцину зменшує здатність метформіну коригувати гіперглікемію та обмін H_2S у нирках.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **гідроген сульфід; глюкоза; метаболізм; нирки; метформін; NaHS; пропаргілгліцин; нефротоксичність; цукровий діабет.**

ВСТУП. Діабетична нефропатія належить до тяжких мікросудинних ускладнень цукрового діабету (ЦД) і є однією з причин інвалідизації та смертності пацієнтів [1]. Важливу роль в її лікуванні відіграє цукрознижувальний препарат із групи бігуанідів "Метформін" [2]. У клінічних дослідженнях показано, що використання метформіну асоціюється зі зменшенням смертності, кардіоваскулярної захворюваності та зниженням прогресування хронічної ниркової недостатності у пацієнтів з нефропатією при ЦД 2 типу. На сьогодні проводять інтенсивні дослідження щодо вивчення молекулярних механізмів, які забезпечують високу нефропротекторну активність цього препарату. Відомо, що захисний вплив метформіну щодо нирок опосередковується через різноманітні шляхи: зменшення глікозилування протеїнів мембран, зниження активності запалення, оксидативного стресу, апоптозу, нефросклерозу та ін. [3]. Однак питання про сигнальні шляхи, з якими асоціюється високий

© О. Б. Струтинська, А. В. Мельник, 2022.

ренопротекторний потенціал метформіну, все ще залишається відкритим.

Останні десятиліття присвячено вивченню системи гідроген сульфіду (H_2S) – нового сигнального шляху, залученого до регуляції функціонального стану нирок у нормі та при ЦД [1, 4, 5]. Відомо, що при експериментальному ЦД відмічають дефіцит H_2S у нирках, який тісно корелює з тубулогломерулярними порушеннями. Поряд із цим встановлено, що використання донорів H_2S проявляє нефропротекторний потенціал, тоді як застосування інгібіторів його синтезу (пропаргілгліцину – ППГ), навпаки, поглиблює розвиток діабетичної нефропатії [1]. Залишається нез'ясованим питання щодо залученості системи H_2S у нирках до механізмів дії метформіну, а також здатності модуляторів обміну H_2S модифікувати його фармакологічну активність.

Мета дослідження – оцінити вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфіду на рівень глікемії і метаболізм H_2S у нирках щурів при стрептозотоциніндукованому діабеті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експериментальні дослідження проведено на 75 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях (*Rattus norvegicus*) із початковою масою тіла 150–240 г, отриманих з експериментальної біологічної клініки (віварію) Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Тварини перебували в стандартних умовах із природним світловим режимом день/ніч, воду і корм одержували *ad libitum*. Тварин годували напівсинтетичною крохмально-казеїновою дієтою із збалансованим вмістом усіх макро- та мікронутрієнтів. Дослідження проведено відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), а також Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006 р. № 3447-IV.

Тварин випадковим чином розподілили на 5 груп (по 15 особин у кожній). Цукровий діабет моделювали в 4 групах після попередньої 24-годинної депривації їжі шляхом одноразового інтраперитонеального введення свіжоприготовленого розчину стрептозотоцину ("Sigma", США) на 0,1 М цитратному буфері (pH 4,5) в дозі 40 мг/кг маси щура. У такій дозі стрептозотоцин спричиняв стійку гіперглікемію, яка не супроводжувалась діабетичним кетоацидозом та не викликала смертності тварин [6]. Через 72 год після ін'єкції стрептозотоцину проводили об'єктивну оцінку успішності моделювання цукрового діабету шляхом визначення рівня глюкози. Для подальших досліджень відбирали тварин, рівень глікемії в яких перевищував 16,7 ммоль/л. З 3-ї до 28-ї доби щурам 3 груп (3-ї, 4-ї і 5-ї) 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). Тваринам 4-ї групи, крім метформіну, вводили інтраперитонеально донор H_2S – $NaHS{\cdot}H_2O$ ("Sigma", США) в дозі 56 мкмоль/кг 1 раз на добу. Щурам 5-ї групи, крім метформіну, вводили інтраперитонеально інгібітор синтезу H_2S – D,L-пропаргілгліцин ("Sigma", США) в дозі 442 мкмоль/кг 1 раз на добу. Тваринам контрольної групи (1-ї) вводили інтраперитонеально еквівалентну кількість 0,1 М цитратного буфера з pH 4,5 (з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси тіла). Дози, шляхи і тривалість введення метформіну, NaHS та пропаргілгліцину було запозичено з літератури при проведенні подібних експериментальних досліджень [2, 7].

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

Для досліджень використовували периферичну кров із хвостової вени та пост'ядерний супернатант гомогенату нирок. Периферичну кров отримували з кінчика хвоста шляхом нанесення поверхневих насічок із застосуванням скарифікатора, сироватку крові – центрифугуванням цільної венозної крові при 1500 об./хв протягом 20 хв. Аліквоти сироватки відбирали в мікропробірки Eppendorf і зберігали при -20 °С до моменту проведення аналізу.

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 % трихлороцтової кислоти, центрифугували при 1200 g 15 хв і відбирали супернатант, який відразу ж використовували для досліджень.

Для інших досліджень супернатант гомогенату нирок отримували таким чином: нирки гомогенізували в середовищі 0,25 М сахарози, 0,01 М Трис (pH 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 у периферичній крові щурів визначали, використовуючи глюкометр "Accu-Chek Active" ("Rouche Group", Німеччина). Вміст H_2S у супернатанті гомогенату нирок оцінювали спектрофотометричним методом за реакцією утворення метиленового синього при наявності N,N-диметил-пара-фенілендіаміну та $FeCl_3$ [8].

Активність H_2S-синтезувальних ензимів – цистатіонін-γ-ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистатіонін-β-синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22), цистеїнамінотрансферази/3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (ЦАТ/3-МСТ, КФ 2.6.1.3/КФ 2.8.1.2) у супернатанті гомогенату нирок визначали за приростом гідроген сульфіду [8], використовуючи адаптовані за складом та активною кислотністю інкубаційні середовища, підібраними тривалістю і температурою інкубації, що забезпечує створення оптимальних умов для функціонування ензимів [9]. Швидкість утилізації H_2S визначали в супернатанті гомогенату нирок за зменшенням рівня сульфід-аніона в інкубаційному середовищі [10]. Активність тіоредоксинредуктази (ТРР, КФ 1.8.1.9) у нирках оцінювали за швидкістю відновлення 5,5′-дитіобіс(2-нітробензоату) – DTNB при наявності NADPH [11]. Вміст протеїну в нирках визначали за методом Лоурі [12].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми SPSS STATISTICA 17.0. Результати представляли у вигляді середньої арифметичної та середньої помилки середньої арифметичної (M±m). Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Колмогорова – Смірнова. Вірогідність різниці між показниками визначали залежно від типу розподілу: при нормальному розподілі – за параметричним t-критерієм Стьюдента, а при 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 досліджували вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну H_2S на стрептозотоциніндуковані зміни рівня глікемії (рис.). На 28-му добу після одноразового введення стрептозотоцину реєстрували вірогідне зростання рівня глюкози у крові в 4,6 раза ($p<0,001$) відносно контролю. Застосування метформіну достовірно зменшувало рівень глікемії на 25,2 % ($p<0,001$) порівняно з нелікованими тваринами із стрептозотоциніндукованим діабетом (СТЦ-діабетом). Моделювання рівня гідроген сульфіду шляхом використання донора H_2S – NaHS та інгібітора його синтезу – ППГ змінювало гіпоглікемічну активність метформіну. Так, введення NaHS потенціювало гіпоглікемічну дію метформіну: рівень глюкози у крові на 17,9 % менший ($p<0,001$), ніж у групі "СТЦ-діабет+метформін", але все ще вірогідно більший у 2,8 раза ($p<0,001$) порівняно з контролем. Натомість застосування

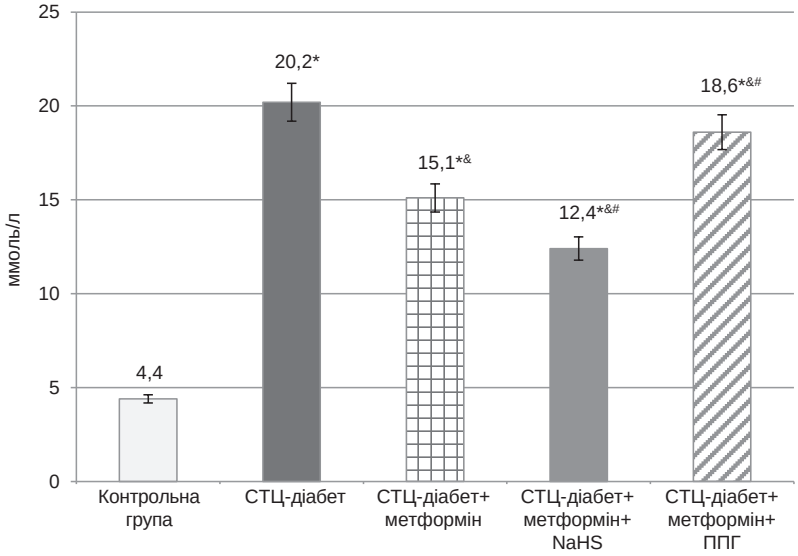

Рис. Вплив метформіну і його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфіду на рівень глікемії у щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом та при дії метформіну (M±m, n=15).

Примітки. Тут і в таблицях 1, 2:

1. * – $p<0,05$ відносно контрольної групи.
2. & – $p<0,05$ стосовно нелікованої групи тварин із СТЦ-діабетом.
3. # – $p<0,05$ щодо щурів із СТЦ-діабетом, лікованих метформіном.

пропаргілгліцину, навпаки, знижувало гіпоглікемічну активність метформіну: вміст глюкози у крові на 23,2 % більший (p<0,001), ніж у групі "СТЦ-діабет+метформін", і в 4,3 раза (p<0,001) перевищував показник контрольної групи.

У подальшому ми досліджували вплив метформіну при різному рівні насиченості організму щурів H_2S на індуковані стрептозотоцином зміни вмісту H_2S та активності H_2S-синтезувальних ензимів у нирках (табл. 1). При СТЦ-діабеті відмічали зниження вмісту H_2S на 33,2 % (p<0,001) відносно контролю. Водночас реєстрували зменшення швидкості синтезу H_2S у реакціях, каталізованих ЦГЛ, ЦБС і ЦАТ/3-МСТ, відповідно, на 58,1, 37,8 та 45,3 % (p<0,001) порівняно з показниками контрольної групи. Застосування метформіну зменшувало пертурбації в синтезі H_2S у нирках при СТЦ-діабеті: рівень H_2S та активність ЦГЛ, ЦБС і ЦАТ/3-МСТ були більшими, відповідно, на 27,9, 60,0, 18,6 та 27,9 % (p<0,001) відносно нелікованих тварин. Використання модуляторів обміну H_2S мало різноспрямований вплив на метформіностимульоване продукування H_2S у нирках при СТЦ-діабеті. Застосування NaHS посилювало активуючий вплив метформіну на синтез H_2S у нирках: рівень H_2S та активність ЦГЛ, ЦБС і ЦАТ/3-МСТ були вищими, відповідно, на 13,5, 38,3, 32,0 та 30,2 % (p<0,01). Водночас за умов введення пропаргілгліцину відмічено втрату здатності метформіну стимулювати продукування H_2S у нирках при СТЦ-діабеті: у групі тварин "СТЦ-діабет+метформін+ППГ" вміст H_2S та активність ЦГЛ, ЦБС і ЦАТ/3-МСТ вірогідно не відрізнялись від таких у нелікованих щурів.

Далі ми оцінювали зміни активності утилізації H_2S та швидкості його депонування у складі персульфідів з участю ТРР у нирках щурів досліджуваних груп (табл. 2). При СТЦ-діабеті відмічали збільшення швидкості утилізації H_2S на 79,4 % (p<0,001) та зниження активності ТРР на 38,8 % (p<0,001) порівняно з контролем. Використання метформіну зменшувало швидкість утилізації H_2S на 32,7 % (p < 0,001) та підвищувало активність ТРР на 15,2 % (p < 0,05) відносно нелікованих тварин. Введення NaHS посилювало вплив метформіну на утилізацію та депонування H_2S у нирках, тоді як введення ППГ чинило протилежну дію. У групі тварин "СТЦ-діабет+метформін+NaHS" швидкість утилізації H_2S була меншою на 16,1 % (p<0,05), а активність ТРР – більшою на 27,6 % (p<0,001), ніж у щурів, лікованих лише метформіном. Натомість у групі тварин "СТЦ-діабет+метформін+ППГ" активність утилізації H_2S та швидкість його депонування у складі персульфідів з участю ТРР вірогідно не відрізнялись від таких у нелікованих тварин із СТЦ-діабетом.

Проведені дослідження засвідчили, що одноразове введення стрептозотоцину спричиняє розвиток гіперглікемії, що супроводжується формуванням дефіциту H_2S, зменшенням H_2S-синтезувальної активності ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ/3-МСТ, збільшенням швидкості утилізації H_2S та зниженням здатності H_2S депонуватись у формі персульфідів з участю ТРР. Отримані результати знаходять своє підтвердження в літературі при проведенні подібних досліджень [1, 4, 5].

Використання метформіну проявляє потужну гіпоглікемічну активність та зменшує пертурбації

Таблиця 1 – **Вплив метформіну і його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфіду на вміст H_2S та активність H_2S-синтезувальних ензимів у нирках щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом (M±m, n=15)**

Група тварин	H_2S, нмоль/мг протеїну	Активність ензимів, нмоль H_2S/хв·мг протеїну		
		ЦГЛ	ЦБС	ЦАТ/3-МСТ
Контрольна	3,65±0,12	1,79±0,13	2,33±0,09	2,33±0,09
СТЦ-діабет	2,44±0,10*	0,750±0,023*	1,45±0,05*	1,45±0,05*
СТЦ-діабет+метформін	3,12±0,14*&	1,20±0,08*&	1,72±0,06*&	1,72±0,06*&
СТЦ-діабет+метформін+NaHS	3,54±0,14&#	1,66±0,11&#	2,27±0,08&#	2,33±0,11&#
СТЦ-діабет+метформін+ППГ	2,51±0,09*&#	0,736±0,018*&#	1,51±0,04*&#	1,50±0,05*&#

Таблиця 2 – **Вплив метформіну і його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфіду на швидкість утилізації H_2S та активність тіоредоксинредуктази в нирках щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом (M±m, n=15)**

Група тварин	Активність ТРР, нмоль DTNB/хв·мг протеїну	Швидкість утилізації H_2S, нмоль S^{2-}/хв·мг протеїну
Контрольна	4,72±0,17	0,730±0,04
СТЦ-діабет	2,89±0,13*	1,31±0,08*
СТЦ-діабет+метформін	3,33±0,14*&	0,882±0,063*&
СТЦ-діабет+метформін+NaHS	4,25±0,18&#	0,740±0,03&#
СТЦ-діабет+метформін+ППГ	2,90±0,12*&#	1,25±0,05*&#

метаболізму H_2S у нирках: вірогідно зростають рівень H_2S, H_2S-синтезувальна активність ЦГЛ, ЦБС, ЦАТ/3-МСТ, зменшується швидкість утилізації H_2S та підвищується активність ТРР. У літературі ми знайшли лише 2 публікації щодо впливу метформіну на рівень H_2S. Так, за даними B. Wiliñski та ін. (2013), в інтактних щурів застосування метформіну вірогідно збільшує рівень H_2S у мозку, серці, нирках та печінці [13]. У роботі A. Hussain Lodhi та ін. (2021) показано, що використання метформіну при експериментальному ЦД достовірно збільшує запаси H_2S у нирках [14]. Водночас на сьогодні відсутні літературні дані щодо впливу метформіну на активність, експресію H_2S-синтезувальних ензимів, швидкість його деградації і депонування в нормі та при цукровому діабеті.

Кореляційний аналіз, який ми провели, надав докази того, що вплив метформіну на метаболізм H_2S у нирках спряжений з його гіпоглікемічною активністю. За цих умов між рівнем глюкози у сироватці крові й рівнем H_2S, активністю H_2S-синтезувальних ензимів та активністю ТРР виникали помірної сили обернені кореляції (r_s=-(0,60–0,8), p<0,001), а зі швидкістю утилізації H_2S – прямі кореляції (r_s=0,65, p<0,001). Існування взаємозв'язку між рівнем глікемії і метаболізмом H_2S підтверджують також дані літератури. У популяційних дослідженнях показано наявність тісної асоціації між високим рівнем глікемії, порушенням толерантності до глюкози та низьким сироватковим рівнем H_2S [15]. Поряд із цим існує цілий ряд експериментальних досліджень *in vitro* щодо впливу гіперглікемії на обмін H_2S. Так, інкубація ендотеліальних клітин пупкової вени людини, мезангіальних клітин, адипоцитів і гломерулярних подоцитів мишей з високою концентрацією глюкози супроводжувалася зниженням H_2S-синтезувальної активності ЦГЛ, а інкубація ендотеліальних клітин клубочків – зменшенням експресії ЦГЛ та ЦБС [16–20].

Застосування модуляторів обміну гідроген сульфіду модифікувало гіпоглікемічну активність метформіну та його вплив на обмін H_2S у нирках при СТЦ-діабеті. Введення донора гідроген сульфіду – NaHS посилювало гіпоглікемічну активність метформіну та його здатність коригувати обмін H_2S у нирках, тоді як використання інгібітора ППГ мало протилежний ефект. Результати, які ми отримали щодо впливу пропаргілгліцину та NaHS на обмін H_2S, знаходять своє підтвердження в літературі [1]. Водночас літературні дані стосовно впливу системи H_2S на метаболізм глюкози досить суперечливі. Показано, що H_2S пригнічував секрецію інсуліну β-клітинами підшлункової залози через активацію $K_{АТФ}$-каналів і збільшував гіперглікемію, тоді як пропаргілгліцин, навпаки, проявляв гіпоглікемічну активність [21]. В інших дослідженнях встановлено, що введення донорів H_2S зменшувало інсулінорезистентність скелетних м'язів та жирової тканини, збільшувало експресію транспортера ГЛЮТ-4 та захоплення тканинами глюкози, знижувало рівень глікемії [22, 23]. Існують дані, що в мишей, нокаутованих по гену ЦГЛ, зростає інсулінорезистентність скелетних м'язів [24]. У деяких дослідженнях встановлено білатеральний вплив донорів H_2S на інсуліночутливість адипоцитів: за фізіологічних умов вони зменшували чутливість рецепторів до інсуліну, тоді як за умов стресу, гіпоксії, навпаки, збільшували [25, 26]. У роботі G. J. Dugbartey та ін. (2022) показано, що застосування інгібітора синтезу H_2S підвищувало рівень глікемії, індекс HOMA і не впливало на рівень інсуліну [27]. Імовірно, виявлений нами вплив модуляторів обміну H_2S на гіпоглікемічну активність метформіну можна пояснити їх різноспрямованим впливом на інсулінорезистентність (NaHS – зменшує, а ППГ – збільшує) жирової тканини та скелетних м'язів при СТЦ-діабеті.

ВИСНОВКИ. 1. Стрептозотоциніндукований діабет викликає вірогідне зростання у крові рівня глюкози в 4,6 раза (p<0,001), що супроводжується зниженням у нирках вмісту H_2S на 33,2 % (p<0,001), активності H_2S-синтезувальних ензимів (ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ/3-МСТ) на 37,8–58,1 % (p<0,001), активності депонування H_2S з участю тіоредоксинредуктази на 38,8 % (p<0,001) та збільшенням швидкості утилізації H_2S на 79,4 % (p<0,001) порівняно з показниками контрольної групи.

2. Застосування метформіну при СТЦ-діабеті проявляє гіпоглікемічну активність (рівень глюкози знижується на 25,2 %, p<0,001, порівняно з нелікованими тваринами), зменшує дефіцит H_2S у нирках (рівень H_2S зростає на 27,9 %, p<0,001), підвищує активність H_2S-синтезувальних ензимів (на 18,6–60,0 %, p<0,001), активність тіоредоксинредуктази (на 15,2 %, p<0,05) та зменшує швидкість утилізації H_2S (на 32,7 %, p<0,001).

3. Введення донора гідроген сульфіду – NaHS потенціює гіпоглікемічну активність метформіну та його здатність коригувати обмін H_2S у нирках, тоді як введення інгібітора синтезу гідроген сульфіду – ППГ має протилежний ефект при СТЦ-діабеті.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять поглибити розуміння ролі системи H_2S у механізмах нефропротекторної дії метформіну при експериментальному цукровому діабеті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hydrogen sulfide: Recent progression and perspectives for the treatment of diabetic nephropathy / H. J. Sun, Z. Y. Wu, L. Cao [et al.] // Molecules. – 2019. – **24**, No. 15. DOI: 10.3390/molecules24152857.

2. 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. – **46**, No. 6. – P. 627–632. DOI: 10.4103/0253-7613.144924.

3. Kawanami D. Significance of metformin use in diabetic kidney disease / D. Kawanami, Y. Takashi, M. Tanabe // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – **21**, No.12. DOI: 10.3390/ijms21124239.

4. Beck K. F. The Pathophysiology of H2S in Renal Glomerular Diseases / K. F. Beck, J. Pfeilschifter // Biomolecules. – 2022. – **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. – **44**, No. 1. – P. 1289–1308. DOI: 10.1080/0886022X.2022.2107936.

6. Hydrogen sulfide reduced renal tissue fibrosis by regulating autophagy in diabetic rats / L. Li, T. Xiao, F. Li [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2017. – **16**, No. 2. – P. 1715–1722. DOI: 10.3892/mmr.2017.6813. Epub 2017 Jun 20.

7. Hydrogen sulphide treatment prevents renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the expression of ICAM-1 and NF-kB concentration in normotensive and hypertensive rats / S. F. Hashmi, H. A. Rathore, M. A. Sattar [et al.] // Biomolecules. – 2021. – **11**, No. 10. DOI: 10.3390/biom11101549.

8. Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs / B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi [et al.] // Folia Med Cracov. – 2011. – **51**, No. 1–4. P. 29–35.

9. Мельник А. В. Активність ензимів синтезу гідроген сульфіду в нирках щурів / А. В. Мельник, О. О. Пентюк // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 4. – С. 12–22.

10. Пат. на корисну модель 87884 Україна, UA МПК (2013) G01N 30/22. Спосіб визначення утилізації H_2S в органах тварин / Заічко Н. В., Ольховський О. С., Юрченко П. О., Мельник А. В., Штатько О. І. ; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів ВНМУ ім. М. І. Пирогова. – № u201310024 ; заявл. 12.08.13 ; опубл. 25.02.14, Бюл. № 4.

11. Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines / H. I. Jung, H. W. Lim, B. C. Kim [et al.] // Yonsei Medical Journal. – 2004. – **45**, No. 2. – P. 263–272. DOI: 10.3349/ymj.2004.45.2.263

12. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. – **193**, No. 1. – P. 265–275. https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf

13. Metformin raises hydrogen sulfide tissue concentrations in various mouse organs / B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi [et al.] // Pharmacol. Rep. – 2013. – **65**, No. 3. – P. 737–742. DOI: 10.1016/s1734-1140(13)71053-3.

14. 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. – **15**. – P. 1031–1043. DOI: 10.2147/DDDT.S291591.

15. Association between serum hydrogen sulfide concentrations and dysglycemia: a population-based study / Z. Bahadoran, S. Jeddi, P. Mirmiran [et al.] // BMC Endocr Disord. – 2022. – **22**, No. 1. DOI: 10.1186/s12902-022-00995-8.

16. Bełtowski J. Hydrogen sulfide in the adipose tissue – physiology, pathology and a target for pharmacotherapy / J. Bełtowski, A. Jamroz-Wis´niewska // Molecules. – 2017. – **22**. DOI: 10.3390/molecules22010063.

17. Effects of hydrogen sulfide on high glucose-induced glomerular podocyte injury in mice / Y. Liu, H. Zhao, Y. Qiang [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – **8**, No. 6. – P. 6814–6820.

18. High glucose induces mouse mesangial cell overproliferation via inhibition of hydrogen sulfide synthesis in a TLR-4-dependent manner / T. Ding, W. Chen, J. Li [et al.] // Cell Physiol Biochem. – 2017. – **41,** No. 3. – P. 1035–1043. DOI: 10.1159/000461483.

19. Hydrogen sulfide mitigates hyperglycemic remodeling via liver kinase B1-adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling / S. Kundu, S. Pushpakumar, S. J. Khundmiri, U. Sen // Biochim. Biophys Acta. – 2014. – **1843**, No. 12. – P. 2816–2826. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.08.005.

20. SKF38393 prevents high glucose (HG)-induced endothelial dysfunction by inhibiting the effects of HG on cystathionine γ-lyase/hydrogen sulfide activity and via a RhoA/ROCK1 pathway / G. Q. Chang, S. Z. Bai, F. Q. Sun [et al.] // Front Biosci (Landmark Ed). – 2022. – **27**, No. 2. DOI: 10.31083/j.fbl2702049.

21. Effects of hydrogen sulfide on carbohydrate metabolism in obese type 2 diabetic rats / S. Gheibi, S. Jeddi, K. Kashfi, A. Ghasemi // Molecules. – 2019. – **24**, No. 1. DOI: 10.3390/molecules24010190.

22. H(2)S inhibits hyperglycemia-induced intrarenal renin-angiotensin system activation via attenuation of reactive oxygen species generation / H. Xue, P. Yuan, J. Ni [et al.] // PLoS One. – 2013. – **8**, No. 9. DOI: 10.1371/journal.pone.0074366.

23. Hydrogen sulfide regulates insulin secretion and insulin resistance in diabetes mellitus, a new promising target for diabetes mellitus treatment? A review / H. Zhang, Y. Huang, S. Chen [et al.] // J. Adv. Res. – 2020. – **27**. – P. 19–30. DOI: 10.1016/j.jare.2020.02.013.

24. Skeletal muscle CSE deficiency leads to insulin resistance in mice / M. Xu, X. Liu, P. Bao [et al.] // Antioxidants (Basel). – 2022. – **11**, No. 11. DOI: 10.3390/antiox11112216.

25. Hydrogen sulfide, adipose tissue and diabetes mellitus / L. Zhu, B. Yang, D. Ma [et al.] // Diabetes Metab. Syndr. Obes. – 2020. – **13**. – P. 1873–1886. DOI: 10.2147/DMSO.S249605.

26. Parsanathan R. Hydrogen sulfide regulates irisin and glucose metabolism in myotubes and muscle of HFD-fed diabetic mice // R. Parsanathan, S. K. Jain // Antioxidants (Basel). – 2022. – **11**, No. 7. DOI: 10.3390/antiox11071369.

27. Targeting hepatic sulfane sulfur/hydrogen sulfide signaling pathway with α-lipoic acid to prevent diabetes-induced liver injury via upregulating hepatic CSE/3-MST expression / G. J. Dugbartey, K. K. Alornyo, I. Adams [et al.] // Diabetol. Metab. Syndr. – 2022. – **14**, No. 1. DOI: 10.1186/s13098-022-00921-x.

REFERENCES

1. Sun, H.J., Wu, Z.Y., Cao, L., Zhu, M.Y., Liu, T.T. … Bian J.S. (2019). Hydrogen sulfide: Recent progression and perspectives for the treatment of diabetic nephropathy. *Molecules,* 24 (15). DOI: 10.3390/molecules24152857.

2. Maheshwari, R.A., Balaraman, R., Sen, A.K., & Seth, A.K. (2014). Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats. *Indian J. Pharmacol.*, 46 (6), 627-632. DOI: 10.4103/0253-7613.144924.

3. Kawanami, D., Takashi, Y., & Tanabe, M. (2020). Significance of metformin use in diabetic kidney disease. *Int. J. Mol. Sci.,* 21 (12). DOI: 10.3390/ijms21124239.

4. Beck, K.F., & Pfeilschifter, J. (2022). The pathophysiology of H2S in renal glomerular diseases. *Biomolecules,* 12 (2). DOI: 10.3390/biom12020207.

5. Feng, J., Lu, X., Li, H., & Wang, S. (2022). The roles of hydrogen sulfide in renal physiology and disease states. *Ren. Fail,* 44 (1), 1289-1308. DOI: 10.1080/0886022X.2022.2107936.

6. Li, L., Xiao, T., Li, F., Li, Y., Zeng, O., … Yang, J. (2017). Hydrogen sulfide reduced renal tissue fibrosis by regulating autophagy in diabetic rats. *Mol. Med. Rep.,* 16 (2),1715-1722. DOI: 10.3892/mmr.2017.6813. Epub 2017 Jun 20.

7. Hashmi, S.F., Rathore, H.A., Sattar, M.A., Johns, E.J., Gan, C.Y., Chia, T.Y., & Ahmad, A. (2021). Hydrogen sulphide treatment prevents renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the expression of ICAM-1 and NF-kB concentration in normotensive and hypertensive rats. *Biomolecules,* 11 (10). DOI: 10.3390/biom11101549.

8. Wiliński B., Wiliński J., Somogyi E., Piotrowska J. & Góralska M. (2011). Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs. *Folia Med. Cracov.,* 51 (1-4), 29-35.

9. Melnik A.V., & Pentiuk, O.O. (2009). Activity of hydrogen sulfide production enzymes in kidneys of rats. *Ukrainian Biochemical Journal,* 81 (4), 12-23 [in Ukrainian].

10. Zaichko, N.V., Olkhovskyi, O.S., Yurchenko, P.O., Melnyk, A.V., & Shtatko, O.I. (2013). *Method for determination of utilization of hydrogen sulfide in animal organs* (Patents of Ukraine for utility models № 87884). State intellectual property service of Ukraine. https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=197439 [in Ukrainian].

11. Jung, H.I., Lim, H.W., Kim, B.C., Park, E.H., & Lim, C.J. (2004). Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Yonsei Medical Journal,* 45 (2), 263-272. DOI: 10.3349/ymj.2004.45.2.263

12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry,* 193 (1), 265-275. https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf

13. Wiliński, B., Wiliński, J., Somogyi, E., Piotrowska, J., & Opoka, W. (2013). Metformin raises hydrogen sulfide tissue concentrations in various mouse organs. *Pharmacol. Rep.,* 65 (3), 737-742. DOI: 10.1016/s1734-1140(13)71053-3.

14. Hussain Lodhi, A., Ahmad, F.U., Furwa, K., & Madni, A. (2021). Role of oxidative stress and reduced endogenous hydrogen sulfide in diabetic nephropathy. *Drug Des. Devel.,* 15, 1031-1043. DOI: 10.2147/DDDT.S291591.

15. Bahadoran, Z., Jeddi, S., Mirmiran, P., Kashfi, K., Azizi, F., & Ghasemi, A. (2022). Association between serum hydrogen sulfide concentrations and dysglycemia: a population-based study. *BMC Endocr. Disord.,* 22 (1). DOI: 10.1186/s12902-022-00995-8.

16. Bełtowski, J., & Jamroz-Wis´niewska, A. (2017). Hydrogen sulfide in the adipose tissue – physiology, pathology and a target for pharmacotherapy. *Molecules,* 22. DOI: 10.3390/molecules22010063.

17. Liu, Y., Zhao, H., Qiang, Y., Qian, G., Lu, S. … Fu, Y. (2015). Effects of hydrogen sulfide on high glucose-induced glomerular podocyte injury in mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.,* 8 (6), 6814-6820.

18. Ding, T., Chen, W., Li, J., Ding, J., Mei, X., & Hu, H. (2017). High glucose induces mouse mesangial cell overproliferation via inhibition of hydrogen sulfide synthesis in a TLR-4-dependent manner. *Cell Physiol. Biochem.,* 41 (3), 1035-1043. DOI: 10.1159/000461483.

19. Kundu, S., Pushpakumar, S., Khundmiri, S. J., & Sen, U. (2014). Hydrogen sulfide mitigates hyperglycemic remodeling via liver kinase B1-adenosine monphosphate-activated protein kinase signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1843 (12), 2816-2826. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.08.005.

20. Chang, G.Q., Bai, S.Z., Sun, F.Q., Wu, R., Wei, C. … Li, H.Z. (2022). SKF38393 prevents high glucose (HG)-induced endothelial dysfunction by inhibiting the effects of HG on cystathionine γ-lyase/hydrogen sulfide activity and via a RhoA/ROCK1 pathway. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 27 (2). DOI: 10.31083/j.fbl2702049.

21. Gheibi, S., Jeddi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2019). Effects of hydrogen sulfide on carbohydrate metabolism in obese type 2 diabetic rats. *Molecules,* 24 (1). DOI: 10.3390/molecules24010190.

22. Xue, H., Yuan, P., Ni, J., Li, C., Shao, D. … Lu L. (2013). H(2)S inhibits hyperglycemia-induced intrarenal renin-angiotensin system activation via attenuation of reactive oxygen species generation. *PLoS One,* 8 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0074366.

23. Zhang, H., Huang, Y., Chen, S., Tang, C., Wang, G. … Jin, H. (2020). Hydrogen sulfide regulates insulin secretion and insulin resistance in diabetes mellitus, a new promising target for diabetes mellitus treatment? A review. *J. Adv. Res.,* 26, 19-30. DOI: 10.1016/j.jare.2020.02.013.

24. Xu, M., Liu, X., Bao, P., Wang, Y., Zhu, X. … Lu J. (2022). Skeletal Muscle CSE Deficiency Leads to Insulin Resistance in Mice. *Antioxidants (Basel),* 11 (11). DOI: 10.3390/antiox11112216.

25. Zhu, L., Yang, B., Ma, D., Wang, L., & Duan, W. (2020). Hydrogen sulfide, adipose tissue and diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.,* 13, 1873-1886. DOI: 10.2147/DMSO.S249605.

26. Parsanathan, R., & Jain, S.K. (2022). Hydrogen sulfide regulates irisin and glucose metabolism in myotubes and muscle of HFD-fed diabetic mice. *Antioxidants (Basel),* 11 (7). DOI: 10.3390/antiox11071369.

27. Dugbartey, G.J., Alornyo, K.K., Adams, I., Atule, S., Obeng-Kyeremeh, R. … Adjei S. (2022). Targeting hepatic sulfane sulfur/hydrogen sulfide signaling pathway with α-lipoic acid to prevent diabetes-induced liver injury via upregulating hepatic CSE/3-MST expression. *Diabetol. Metab. Syndr.,* 14 (1). DOI: 10.1186/s13098-022-00921-x.

O. B. Strutynska, A. V. Melnyk
M. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

THE EFFECT OF METFORMIN AND ITS COMBINATION WITH MODULATORS OF HYDROGEN SULPHIDE METABOLISM ON THE LEVEL OF GLYCEMIA AND THE STATE OF THE H_2S SYSTEM IN THE KIDNEYS OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

Summary

Introduction. *Diabetic nephropathy belongs to one of the severe microvascular complications of diabetes mellitus (DM) and is one of the causes of patient disability and mortality. An important role in the treatment of diabetic nephropathy belongs to the sugar-lowering drug metformin. The question of the molecular mechanisms of metformin's action, in particular the role of the H_2S signaling system in its pharmacological activity, remains unclear.*

The aim of the study *– to evaluate the effect of metformin and its combination with modulators of H_2S, exchange on the level of glycemia and H_2S metabolism in the kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes.*

Materials and Methods. *The experiments were performed on 75 white non-linear male rats weighing 150–240 g. The animals were divided into five groups: group 1 – control; group 2 – animals with experimental DM, which was initiated by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (40 mg/kg of weight) in 0.1 M citrate buffer (pH 4,5); group 3 – animals with experimental DM were treated with metformin (500 mg/kg/day, intragastrically) from the 3rd to the 28th day; group 4 – animals with DM along with metformin were given NaHS (56 μmol/kg/day, intragastrically); group 5 – animals with DM along with metformin, were administered propargylglycine (PPG, 442 μmol/kg/day, intragastrically). The glucose content was determined in the peripheral blood. H_2S level, activity of H_2S-synthesizing enzymes (cystathionine-γ-lyase – CSE, cystathionine-β-synthase – CBS, cysteineaminotransferase/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase – CAT/3-MST), activity of thioredoxin reductase (TRR) and rate of H_2S utilization were evaluated in the supernatant of the kidney homogenate,*

Results and Discussion. *It was established that streptozotocin-induced diabetes (ST-diabetes) causes a significant increase in blood glucose levels (by 4.6 times, $p<0.001$), a decrease of H_2S contents, activity of H_2S-producing enzymes (CSE, CBS and CAT / 3-MST), activity of TRR in the kidney by 33.2–58.1 % ($p<0.001$) and an increase of H_2S utilization rates by 79.4 % ($p<0.001$) compared with control group. The use of metformin in ST-diabetes reveals hypoglycemic activity (glucose level decreases by 25.2 %, $p<0,001$, compared with untreated animals), reduces H_2S deficiency in the kidneys (H_2S level increases by 27.9 %, $p<0.001$), increases the activity of H_2S-producing enzymes and TRR (by 15.2–60.0 %, $p<0.05$), and also reduces the rate of H_2S utilization (by 32.7 %, $p<0.001$). The introduction of the donor H_2S – NaHS potentiates the hypoglycemic activity of metformin and its ability to correct H_2S exchange in the kidneys while the introduction of the inhibitor of H_2S synthesis – PPG reveals the opposite effect in ST-diabetes.*

Conclusion. *Metformin exhibits hypoglycemic activity and corrects impaired H_2S metabolism in the kidneys in ST-diabetes. The use of NaHS enhanced the hypoglycemic activity of metformin and potentiated its effect on the renal H_2S system in the kidneys while the use of PPG reduced the ability of metformin to correct hyperglycemia and renal H_2S metabolism in the kidneys.*

KEY WORDS: **hydrogen sulfide; glucose; metabolism; kidneys; metformin; NaHS; propargylglycine; nephrotoxicity; diabetes mellitus.**

Отримано 09.11.22

Адреса для листування: *А. В. Мельник, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна, e-mail: anderneting@gmail.com.*