

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ім. М. І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**СТРУТИНСЬКА ОЛЕНА БОРИСІВНА**

УДК: 546.221.1: 616.61:616.379-008.64:612.08

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РОЛЬ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ  
НЕФРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ МЕТФОРМІНУ ЗА  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

091 «Біологія»

09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів має посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ (підписано ЕП) \_\_\_\_\_ О.Б. Струтинська

Науковий керівник: Мельник Андрій Володимирович, доктор медичних наук,  
професор

Вінниця – 2023

## АНОТАЦІЯ

*Струтинська О. Б.* Роль гідроген сульфїду в механїзмах нефропротекторної дії метформїну за експериментального цукрового діабету. – Квалїфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія». – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, 2023.

Дисертація присвячена вирішенню актуального наукового завдання сучасної медицини, що полягає в експериментальному обґрунтуванні нових підходів до фармакокорекції діабетичної нефропатії на основі дослідження ролі гідроген сульфїду ( $H_2S$ ) в молекулярних механїзмах нефропротекторної дії метформїну.

Експериментальні дослідження проведені на 125 білих нелїнійних щурах-самцях. Всі етапи досліджень виконані за загальними етичними принципами експериментів на тваринах згідно Першого національного конгресу України з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», що було засвідчено комісією з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол №8 від 25.10.2018, протокол №4 від 18.05.2023).

В ході експерименту усі піддослідні тварини поділені на п'ять груп. Перша група – контрольна, отримували інтраперитонеально 0,1 М цитратний буфер з рН 4,5 (0,1 мл/ 100 г маси). В другій, третій та 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. В такій дозі стрептозотозин викликав стійку гіперглікемію, яка не супроводжувалась діабетичним кетоацидозом. Через дві доби після

ін'єкції стрептозотоцину визначали рівень глюкози в периферичній крові і для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії більше 16 ммоль/л. З 3-ої по 28-му добу 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). Щурам 4-ої групи поряд з метформіном вводили донор  $\text{H}_2\text{S}$  -  $\text{NaHS}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, США) у дозі 56 мкмоль/кг 1 раз на добу інтраперитонеально. Щурам 5-ої групи поряд з метформіном вводили інгібітор синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  - D,L-пропаргілгліцин (ППГ, Sigma, США) у дозі 442 мкмоль/кг маси 1 раз на добу інтраперитонеально. Дози, шляхи та тривалість введення метформіну,  $\text{NaHS}$  та ППГ були запозичені з літератури при проведенні експериментальних досліджень.

Застосування метформіну за експериментального цукрового діабету викликало зменшення дефіциту  $\text{H}_2\text{S}$  в нирках (рівень  $\text{H}_2\text{S}$  зростав на 27,9 % порівняно з нелікованими тваринами,  $p < 0,001$ ), збільшення активності  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезуючих ферментів цистатіонін- $\gamma$ -ліази, цистатіонін- $\beta$ -синтази та цистеїнамінотрансферази / 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (на 18,6-60,0 %,  $p < 0,001$ ), активності тіоредоксинредуктази (на 15,2 %,  $p < 0,05$ ), зменшення швидкості утилізації  $\text{H}_2\text{S}$  (на 32,7 %,  $p < 0,001$ ), збільшення чутливості ниркових артерій до вазодилатуючої дії  $\text{H}_2\text{S}$  (показник  $\text{EC}_{50}$  ( $\text{H}_2\text{S}$ ) зменшувався на 22,8 %,  $p < 0,01$ ), що чітко асоціювалось ( $|r| = 0,60-0,80$ ,  $p < 0,01$ ) з його гіпоглікемічною активністю (рівень глюкози зменшувався на 25,2 %,  $p < 0,001$ ). Введення донору  $\text{H}_2\text{S}$  натрій гідрогенсульфіду ( $\text{NaHS}$ ) потенціювало гіпоглікемічну активність метформіну (рівень глікемії був менше на 17,9 %,  $p < 0,001$ , порівняно з монотерапією метформіном), здатність препарату коригувати обмін  $\text{H}_2\text{S}$  в нирках та чутливість ниркових артерій до вазодилатуючої дії  $\text{H}_2\text{S}$  (вміст  $\text{H}_2\text{S}$  в нирках був вищим на 13,5 %,  $p < 0,05$ , а показник  $\text{EC}_{50}$   $\text{H}_2\text{S}$  в ниркових артеріях меншим на 29,5 %,  $p < 0,001$ , ніж у щурів, лікованих лише метформіном), тоді як використання інгібітору синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  пропаргілгліцину виявляло протилежний ефект (показники метаболізму

H<sub>2</sub>S в нирках та чутливості ниркових артерій до дії H<sub>2</sub>S вірогідно не відрізнялись від нелікованих тварин з цукровим діабетом).

Використання метформіну на тлі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету викликало зменшення гломерулярних та 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), зниження секреції альдостерону (на 18,1 %,  $p < 0,001$ ) та збільшення натрійурезу (на 18,6 %,  $p < 0,05$ ), що корелювало зі збільшенням рівня H<sub>2</sub>S в нирках ( $|r| = 0,37-0,73$ ,  $p < 0,01$ ). Введення модуляторів обміну H<sub>2</sub>S модифікувало ренопротективну дію метформіну за цукрового діабету: NaHS посилював 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 пропаргілгліцин зменшував нефропротекторну активність метформіну (зменшувався кліренс креатиніну та екскреція натрію з сечею на 11,1-16,9 %,  $p < 0,05$ , зростали протеїнурія та сироватковий рівень альдостерону на 13,6-18,0 %,  $p < 0,05$ , порівняно з монотерапією метформіном).

За експериментального цукрового діабету введення метформіну виявляло антиоксидантний (рівень малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів зменшувався на 24,7-27,4 %,  $p < 0,001$ ), протизапальний (рівень IL-1 $\beta$  знижувався на 25,3 %,  $p < 0,001$ ), антиапоптотичний (рівень каспази-3 знижувався на 36,1 %,  $p < 0,001$ ) та антисклеротичний ефекти (рівень галектину-3 знижувався на 48,4 %,  $p < 0,001$ ) в нирках, що асоціювалось зі збільшенням рівня H<sub>2</sub>S ( $|r| = 0,59-0,75$ ,  $p < 0,01$ ). NaHS потенціював захисну дію метформіну на нирки (рівні галектину-3, каспази-3, IL-1 $\beta$ , малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів у нирках були вірогідно меншими відповідно на 18-37 %,  $p < 0,001$ , ніж у тварин, які отримували лише метформін), тоді як пропаргілгліцин виявляв протилежний ефект (вміст у нирках медіаторів запалення, апоптозу, фіброзу та маркерів пероксидації

ліпідів та протеїнів був достовірно більшим на 18,3-41,6 %,  $p < 0,001$ , ніж у щурів, лікованих лише метформіном).

Застосування метформіну зменшувало ініційовані цукровим діабетом ультраструктурні зміни в нирках - нефросклероз, гіпертрофію клубочків, деструкцію ендотеліоцитів судин, запалення, дистрофію епітеліоцитів проксимальних каналців нефрона. Введення метформіну в комбінації з NaHS більш ефективно ніж монотерапія коригувало пошкодження каналцевого та клубочкового апаратів нирок. В той же час за умов поєднання метформіну та пропаргілгліцину ультраструктурні зміни в нирках наближались до таких у нелікованих тварин з цукровим діабетом.

Результати проведених біохімічних, імуноферментних, електрофізіологічних та гістологічних досліджень поглибили існуючі уявлення щодо ролі  $H_2S$ -сигнальної системи в молекулярних механізмах нефропротекторної активності метформіну за цукрового діабету, а також експериментально обґрунтували можливість та необхідність використання донорів  $H_2S$  з метою оптимізації фармакотерапії діабетичної нефропатії гіпоглікемічним засобом метформіном.

**Ключові слова:** цукровий діабет, нирки, метформін, гідроген сульфід, метаболізм, запалення, оксидативний стрес, фіброз, апоптоз, нефропатія, хронічна хвороба нирок, нефропротектори, щури.

## ANNOTATION

*Strutynska O. B.* The role of hydrogen sulfide in the mechanisms of nephroprotective action of metformin in experimental diabetes. – Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the Doctor of Philosophy Degree (PhD) in the Field of study 09 Biology, Program Subject Area 091 Biology. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine, 2023.

The dissertation is devoted to the solution of the relevant problem, which consists in the experimental substantiation of new approaches to the pharmacological correction of diabetic nephropathy based on the study of the role of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in the molecular mechanisms of the nephroprotective effect of metformin.

Experimental studies have been carried out on 125 white non-linear mature male rats. All stages of the research were carried out in accordance with the provisions of the «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes» (Strasbourg, 1986), Council of Europe Directive 86/609/EEC (1986), the Law of Ukraine «On the Protection of Animals from Cruelty» (No. 3447-IV dated 21.02.2006, Section 26), «General Ethical Principles of Animal Experiments», adopted by the First National Congress of Bioethics of Ukraine (Kyiv, 2001), certified by the Bioethics Committee of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya (protocol No. 8 dated 25.10.2018, No 4. dated 18.05.2023).

During the experiment, all experimental animals were divided into five groups. The first group - control, received intraperitoneally 0.1 M citrate buffer with pH 4.5 (0.1 ml/ 100 g of mass). In the second, third and fourth and fifth groups of animals, diabetes was modeled by a single intraperitoneal injection of a freshly prepared solution of streptozotocin (Sigma, USA) in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) at a dose of 40 mg/kg of rat weight. In such a dose, streptozotocin caused persistent hyperglycemia, which was not accompanied by diabetic ketoacidosis. Two days

after the injection of streptozotocin, the level of glucose in the peripheral blood was determined, and animals with a glycemic level of more than 16 mmol/l were selected for further studies. From the 3rd to the 28th day, rats of the third, fourth and fifth groups were injected intragastrically with metformin (Berlin Chemie, Germany) at a dose of 500 mg/kg once a day in 1% starch gel (at the rate of 1 ml per 100 g of body weight). Rats of the 4th group were injected with the donor H<sub>2</sub>S - NaHS · H<sub>2</sub>O (Sigma, USA) in a dose of 56 μmol/kg once a day intraperitoneally along with metformin. Rats of the 5th group were administered an inhibitor of H<sub>2</sub>S synthesis - D,L-propargylglycine (PPG, Sigma, USA) in a dose of 442 μmol/kg of weight once a day intraperitoneally, along with metformin. Doses, routes and duration of administration of metformin, NaHS and PPG were borrowed from the literature when conducting experimental studies.

The use of metformin in experimental diabetes caused a decrease in H<sub>2</sub>S deficiency in the kidneys (the level of H<sub>2</sub>S increased by 27.9% compared to untreated animals,  $p < 0.001$ ), an increase in the activity of H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes cystathionine  $\gamma$ -lyase, cystathionine  $\beta$ -synthase and cysteine aminotransferase / 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (by 18.6-60.0%,  $p < 0.001$ ), thioredoxin reductase activity (by 15.2%,  $p < 0.05$ ), decrease in the rate of H<sub>2</sub>S utilization (by 32.7%,  $p < 0.001$ ), increased sensitivity of renal arteries to the vasodilatory effect of H<sub>2</sub>S ( $EC_{50}$  (H<sub>2</sub>S) decreased by 22.8%,  $p < 0.01$ ), which was clearly associated ( $|r| = 0.60-0.80$ ,  $p < 0.01$ ) with its hypoglycemic activity (glucose level decreased by 25.2%,  $p < 0.001$ ). Administration of the H<sub>2</sub>S donor sodium hydrosulfide (NaHS) potentiated the hypoglycemic activity of metformin (glycemic level was lower by 17.9%,  $p < 0.001$ , compared to metformin monotherapy), the ability of the drug to correct H<sub>2</sub>S exchange in the kidneys, and the sensitivity of renal arteries to the vasodilatory action of H<sub>2</sub>S (renal H<sub>2</sub>S content was 13.5% higher,  $p < 0.05$ , and  $EC_{50}$  of H<sub>2</sub>S in renal arteries was 29.5% lower,  $p < 0.001$  than in rats treated with metformin alone), whereas the use of an H<sub>2</sub>S synthesis inhibitor propargylglycine showed the opposite effect (indicators of H<sub>2</sub>S metabolism in the kidneys and sensitivity of renal arteries to the action of H<sub>2</sub>S probably did not differ from untreated diabetic animals).

The use of metformin against the background of streptozotocin-induced diabetes caused a decrease in glomerular and tubular disorders (creatinine clearance increased by 13.1%,  $p < 0.05$ , proteinuria decreased by 25.1%,  $p < 0.001$ , the relative water reabsorption rate probably increased), a decrease in aldosterone secretion (by 18.1%,  $p < 0.001$ ) and an increase in natriuresis (by 18.6%,  $p < 0.05$ ), which correlated with an increase in the level of H<sub>2</sub>S in the kidneys ( $|r| = 0.37-0.73$ ,  $p < 0.01$ ). The use of H<sub>2</sub>S-exchange modulators modified the renoprotective effect of metformin in diabetes: NaHS enhanced the corrective effect of metformin on kidney function (creatinine clearance increased by 14.3%,  $p < 0.01$ , proteinuria decreased by 21.2%,  $p < 0.05$ , decreased blood aldosterone by 24.2%,  $p < 0.001$  and increased urinary sodium excretion by 16.3%,  $p < 0.05$ ), while propargylglycine decreased the nephroprotective activity of metformin (creatinine clearance and urinary sodium excretion decreased by 11.1-16.9%,  $p < 0.05$ , proteinuria and serum aldosterone increased by 13.6-18.0%,  $p < 0.05$ , compared to metformin monotherapy).

In experimental diabetes, administration of metformin showed antioxidant (the level of malondialdehyde and carbonyl groups of proteins decreased by 24.7-27.4%,  $p < 0.001$ ), anti-inflammatory (the level of IL-1 $\beta$  decreased by 25.3%,  $p < 0.001$ ), antiapoptotic (the level of caspase-3 decreased by 36.1%,  $p < 0.001$ ) and antisclerotic effects (the level of galectin-3 decreased by 48.4%,  $p < 0.001$ ) in the kidneys, which was associated with an increase in the level of H<sub>2</sub>S ( $|r| = 0.59-0.75$ ,  $p < 0.01$ ). NaHS potentiated the protective effect of metformin on the kidney (the levels of galectin-3, caspase-3, IL-1 $\beta$ , malondialdehyde and protein carbonyl groups in the kidney were significantly lower by 18-37%, respectively,  $p < 0.001$ , than in animals that received only metformin), while propargylglycine showed the opposite effect (the content of mediators of inflammation, apoptosis, fibrosis and markers of lipid and protein peroxidation in the kidneys was significantly higher by 18.3-41.6%,  $p < 0.001$ , than in rats treated only with metformin).

The use of metformin reduced diabetes-induced ultrastructural changes in the kidneys - nephrosclerosis, glomerular hypertrophy, destruction of vascular endotheliocytes, inflammation, dystrophy of epitheliocytes of the proximal tubules



of the nephron. The introduction of metformin in combination with NaHS more effectively than monotherapy corrected damage to the tubular and glomerular apparatus of the kidneys. At the same time, under the conditions of the combination of metformin and propargylglycine, the ultrastructural changes in the kidneys approached those in untreated animals with diabetes.

The results of the conducted biochemical, immunoenzymatic, electrophysiological and histological studies deepened the existing understanding of the role of the H<sub>2</sub>S signaling system in the molecular mechanisms of the nephroprotective activity of metformin in diabetes, and also experimentally substantiated the possibility and necessity of using H<sub>2</sub>S donors in order to optimize the pharmacotherapy of diabetic nephropathy with the hypoglycemic agent metformin.

**Key words:** diabetes, kidney, metformin, hydrogen sulfide, metabolism, inflammation, oxidative stress, fibrosis, apoptosis, nephropathy, chronic kidney disease, nephroprotectors, rats.

## Список публікацій здобувача

### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Роль системи гідроген сульфїду в механїзмах нефропротекторної дії метформїну за стрептозотоцинїндукованого діабету. *Вїсник медичних і біологічних досліджень*, 15(1), 15-21. <https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13352>.
2. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Морфологічні зміни тканин нирок щурів за експериментального цукрового діабету і на тлі корекції метформїном і модуляторами обміну гідроген сульфїду. *Вїсник Вінницького національного медичного університету*, 27(1), 10-16. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-02](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-02)
3. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2022). Вплив метформїну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфїду на рівень глікемії і стан системи H<sub>2</sub>S у нирках щурів при стрептозотоцинїндукованому діабеті. *Медична та клінічна хїмія*, 24(4), 5-12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2022.i4.13565>.
4. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2022). Роль модуляторів обміну гідроген сульфїду в модифікації нефропротекторної дії метформїну за стрептозотоцин-їндукованого діабету. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 16(6), 387-396. <https://doi.org/10.33250/16.06.387>.
5. Паламарчук, І.В., Струтинська, О.Б., Мельник, А.В., & Заїчко, Н.В. (2020). Вплив метформїну та його поєднання з натрій гідрогенсульфїдом на стан системи H<sub>2</sub>S та асоційовані біохїмічні порушення в міокарді та нирках щурів за стрептозотоцин-їндукованого діабету. *Вїсник проблем біології і медицини*, 157(3), 133-137. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137>.
6. Melnyk, A.V., Zaichko, N.V., Palamarchuk, I.V., & Strutynska, O.B. (2020). Effect of H<sub>2</sub>S metabolism modulators on the level of galectin-3 in aorta, heart and kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *European Journal of*

*Biomedical and Life Sciences*, 4, 29-36, <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.

**Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:**

7. Заїчко, Н.В., Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В. (2016). *Застосування натрієвої солі гідрогену сульфїду для потенціювання вазопротективного ефекту антидіабетичних засобів* (Патент України №107767). Державна служба інтелектуальної власності України.

<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=224555>

8. Заїчко, Н.В., Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В. (2016). *Застосування натрієвої солі гідрогену сульфїду для потенціювання антидіабетичної дії метформїну* (Патент України №107765). Державна служба інтелектуальної власності України.

<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=224553>

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

9. Strutynska, O.V., Melnyk, A.V., & Filchukov, D.O. (2020). The role of hydrogen sulphide in the development of experimental diabetic nephropathy. *Scientific Achievements: Projects, Research, Prospects: Materials of the 1st International Scientific-Practical Conference. Starobilsk, Ukraine, December 15-16, 2020* (P. 253 – 254). Luhansk Taras Shevchenko National University

10. Струтинська, О.Б., Мельник, А.В., & Штатько О.І., (2019). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на функціональний стан нирок щурів за експериментального цукрового діабету. *Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. (с. 240-241).*

Медична та клінічна хімія, 21(3, додаток). ТДМУ «Укрмедкнига». <http://www.biochemistry.org.ua/index.php/uk/ubs-society-newsua/5590-11-10-2019-30-04-2019>

11. Струтинська, О.Б. (2019). Стан систему гідроген сульфїду в нирках щурів за експериментального цукрового діабету. *Перший крок в науку – 2019: матеріали XVI міжнародної конференції студентів та молодих вчених, м.*

- Вінниця, 18-19 квітня 2019 р. (с. 467). ВНМУ.  
<https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/4436466> – 467.
12. Струтинська, О.Б., Мельник, А.В., Заїчко, Н.В., & Слободянюк, В.А. (2019). Стан H<sub>2</sub>S-індукованої вазодилатації ниркових артерій за експериментальної діабетичної нефропатії у щурів. *Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка, Київ, 27-30 травня 2019 р. (с. 33). Фізіологічний журнал, 65(3).*  
[https://fz.kiev.ua/journals/2019\\_V.65/2019-3sup/3-supplement\\_%202019.pdf](https://fz.kiev.ua/journals/2019_V.65/2019-3sup/3-supplement_%202019.pdf)
13. Zaichko, N.V., Palamarchuk, I.V., & Strutynska, O.B. (2017). Propargylglycine and hydrogen sulfide effects on plasma galectin-3 in streptozotocin-induced diabetic rats. *VIII Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, 18-20 September 2017, Lublin, Poland: Programme and Book of Abstract (p. 56).* Polihymnia. <https://dspace.vnmu.edu.ua/123456789/2746>
14. Заїчко, Н.В., Паламарчук, І.В., & Струтинська, О.Б. (2017). Вплив антидіабетичних засобів на вміст гідроген сульфідів та активність H<sub>2</sub>S-синтезуючих ензимів в органах щурів із стрептозотоциновим діабетом. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ): матеріали LX науково-практичної конференції, м. Тернопіль, 14 червня 2017 р. (с. 290–292). ТДМУ «Укрмедкнига».*  
<https://repository.tdmu.edu.ua/handle/1/8519>
15. Заїчко, Н.В., Паламарчук, І.В., Струтинська, О.Б., & Штатко, О.І. (2017). Вплив антидіабетичних засобів на систему цистатіонін-гама-ліази/гідроген сульфідів в міокарді та нирках щурів. *Матеріали V Національного з'їзду фармакологів України, м. Запоріжжя, 18-20 жовтня 2017 р. (с. 46).*  
<https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/2745?show=full&locale-attribute=uk>
16. Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В., & Заїчко, Н.В. (2016). Вплив гідроген сульфідів на антидіабетичний ефект метформіну за стрептозотоцинового діабету у щурів. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції*

*«Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні», м Вінниця, 24 лютого 2016 р. (с. 91 – 93). ВНМУ.*

17. Струтинська, О.Б. (2016). Роль системи гідроген сульфїду в розвитку діабетичної нефропатії у щурів. *Матеріали 85-ої науково-практичної конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині», м Івано-Франківськ, 24 – 25 березня 2016 р. (с. 257-258). ДВНЗ «Івано-франківський національний медичний університет».*

<https://www.ifnmu.edu.ua/uk/snt/85-naukovo-praktychna-konferentsiia-studentiv-i-molodykh-vchenykh>

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	16
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА РОЛЬ СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ УРАЖЕННЯ НИРОК ТА НЕФРОПРОТЕКЦІЇ ЗА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	24
1.1 Молекулярні механізми розвитку діабетичної нефропатії	24
1.2 Метаболізм $H_2S$ в нирках та його біологічне значення	31
1.3 Роль $H_2S$ в патогенезі діабетичної нефропатії та нефропротекції	37
1.4 Роль метформіну в лікуванні діабетичної нефропатії	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	46
2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей	46
2.2 Біохімічні та імуноферментні методи дослідження	50
2.3 Електрофізіологічні методи дослідження	53
2.4 Морфологічні дослідження	55
2.5 Методи статистичного аналізу	56
РОЗДІЛ 3 СТАН СИСТЕМИ $H_2S$ В НИРКАХ ТА РІВЕНЬ ГЛІКЕМІЇ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЇ З МОДУЛЯТОРАМИ ОБМІНУ $H_2S$ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ	57
3.1 Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на рівень глюкози в крові, вміст $H_2S$ , активність $H_2S$ -синтезуючих ензимів, загальну швидкість утилізації $H_2S$ в нирках за стрептозотоцин-індукованого діабету	58

3.2	Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на H <sub>2</sub> S-індуковану вазодилатацію ниркових артерій за стрептозотин-індукованого діабету	75
РОЗДІЛ 4	БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ СТАНУ НИРОК ЩУРІВ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЇ З МОДУЛЯТОРАМИ ОБМІНУ H <sub>2</sub> S ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ	81
4.1	Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на функціональний стан нирок щурів за стрептозотин-індукованого діабету	82
4.2	Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на активність процесів запалення, апоптозу, нефросклерозу та оксидативного стресу в нирках щурів за стрептозотин-індукованого діабету	92
РОЗДІЛ 5	ГІСТОЛОГІЧНА СТРУКТУРА НИРОК ЩУРІВ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЇ З МОДУЛЯТОРАМИ ОБМІНУ H <sub>2</sub> S ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ	102
5.1	Структурна організація нирок щурів контрольної групи та за стрептозотин-індукованого діабету	102
5.2	Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на структурну організацію нирок щурів за стрептозотин-індукованого діабету	109
РОЗДІЛ 6	АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	119
ВИСНОВКИ		136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ		138
ДОДАТКИ		167

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АФК	- активні форми кисню
ВР	- відносна реабсорбція
ДІ	- довірчий інтервал
МДА	- малоновий діальдегід
3-МСТ	- 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза
КГП	- карбонільні групи протеїнів
КПГ	- кінцеві продукти глікації
НАДФН	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
ПАЛФ	- піридоксальфосфат
ППГ	- пропаргілгліцин
РААС	- ренін-ангіотензин-альдостеронова система
СОД	- супероксиддисмутаза
СТЦ-діабет	- стрептозотоцин-індукований діабет
ТРР	- тіоредоксинредуктаза
ЦАТ	- цистеїнамінотрансфераза
ЦБС	- цистатіонін- $\beta$ -синтаза
ЦГЛ	- цистатіон- $\gamma$ -ліаза
ЦД	- цукровий діабет
СТGF	- фактор росту сполучної тканини
DAO	- D-амінооксидаза
DTNB	- 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоат) або реактив Елмана
EC <sub>50</sub>	- середньоефективна концентрація
H <sub>2</sub> S	- гідроген сульфід
НОМА	- індекс інсулінорезистентності
IL-1 $\beta$	- інтерлейкін-1 бета
K <sup>+</sup>	- катіони калію
K <sub>АТФ</sub> -канали	- АТФ-чутливі калієві канали



Na <sup>+</sup>	- катіони натрію
NaHS	- натрій гідрогенсульфід
NO	- нітроген монооксид
NF-κB	- ядерний фактор каппа бета
Nrf2	- ядерний фактор еритроїдного походження 2
MAPK	- мітоген-активована протеїнкіназа
S <sup>2-</sup>	- сульфід аніон
TGF-β	- трансформуючий фактор росту бета
TNF-α	- фактор некрозу пухлин альфа
VEGF	- ендотеліальний фактор росту судин

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Діабетична нефропатія належить до важких мікросудинних ускладнень цукрового діабету (ЦД) і є важливою причиною термінальної ниркової недостатності та смертності хворих [178]. Ураження нирок розвивається приблизно у 30 % за ЦД 1 типу та у 40 % за ЦД 2 типу [42]. Діабетична хвороба нирок характеризується стійкою альбумінурією, прогресивним зниженням гломерулярної фільтрації, часто асоціюється з підвищенням артеріального тиску та врешті-решт призводить до розвитку уремії [168]. За діабетичного ураження нирок відмічаються пошкодження судинної стінки, розвиток гломерулосклерозу та тубуло-інтерстиційного фіброзу [102]. В патогенезі діабетичної хвороби нирок тригерним чинником є гіперглікемія, яка викликає ренальні гемодинамічні зміни, розвиток ішемії, запалення, оксидативного стресу, індукцію фіброгенезу в нирках [114, 178].

Важливу роль в лікуванні діабетичної нефропатії належить цукрознижуючому препарату із групи бігуанідів метформіну [1]. В клінічних дослідженнях показано, що використання метформіну асоціюється зі зменшенням смертності, кардіоваскулярної захворюваності та зниженням прогресування хронічної ниркової недостатності у пацієнтів з нефропатією за ЦД II типу [85]. На сьогодні проводяться 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 глікозилювання білків мембран, зниження активності запалення, оксидативного стресу, апоптозу, нефросклерозу та ін [102]. Однак, питання щодо сигнальних шляхів з якими асоціюється високий ренопротективний потенціал метформіну залишається все ще відкритим.

Останні десятиліття присвячені вивченню системи гідроген сульфїду ( $H_2S$ ) - нового сигнального шляху, залученого до регуляції функціонального стану нирок в нормі та за ЦД [37, 70, 178]. Відомо, що за експериментального ЦД відмічається дефіцит  $H_2S$  в нирках, який тісно корелює з тубуло-гломерулярними порушеннями. Поряд з цим встановлено, що використання донорів  $H_2S$  виявляє нефропротекторний потенціал, тоді як застосування інгібіторів синтезу  $H_2S$  (пропаргілгліцину) – навпаки, поглиблює розвиток діабетичної нефропатії [178]. Залишається не вивченим питання щодо залученості системи  $H_2S$  в нирках до механізмів дії метформіну, а також здатності модуляторів обміну  $H_2S$  модифікувати його фармакологічну активність.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота є фрагментом двох планових НДР кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідроген сульфїду та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології» (№ держреєстрації 0113U006461, 2014-2018 рр.), «Роль екзогенних та ендогенних сірковмісних сполук в механізмах ураження внутрішніх органів та цитопротекції за різних патологічних станів» (№ держреєстрації 0119U001142, 2019-2023 рр.). Дисертантка є співвиконавцем вказаних тем.

### **Мета дослідження**

Оцінити роль  $H_2S$  в молекулярних механізмах нефропротекторної дії метформіну за експериментального цукрового діабету і на цій основі патогенетично обґрунтувати нові підходи до корекції діабетичної нефропатії

### **Завдання дослідження**

1. Оцінити вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну  $H_2S$  ( $NaHS$  і пропаргілгліцином) на рівень глікемії та метаболізм  $H_2S$  в нирках (вміст  $H_2S$ , активність  $H_2S$ -синтезуючих ензимів, швидкість утилізації

H<sub>2</sub>S) й чутливість ниркових артерій до вазодилатуючої дії H<sub>2</sub>S за стрептозотоцин-індукованого діабету.

2. Дослідити вплив метформіну та його поєднання з модуляторами обміну H<sub>2</sub>S на функціональний стан нирок та оцінити можливий зв'язок з рівнем H<sub>2</sub>S в нирках щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

3. Оцінити вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на патохімічні механізми ураження нирок (запалення, апоптоз, нефросклероз та оксидативний стрес) за стрептозотоцин-індукованого діабету.

4. Вивчити вплив метформіну та його поєднання з NaHS і пропаргілгліцином на гістологічну структуру нирок щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету.

*Об'єкт дослідження:* біохімічні механізми нефропротекторної дії метформіну за експериментального цукрового діабету.

*Предмет дослідження:* рівень глікемії, показники метаболізму H<sub>2</sub>S в нирках, чутливість ниркових артерій до дії H<sub>2</sub>S, гістологічні та біохімічні параметри функціонування нирок на тлі застосування метформіну та його комбінації з модуляторами обміну H<sub>2</sub>S за експериментального цукрового діабету.

*Методи дослідження:* біохімічні (рівень глюкози, H<sub>2</sub>S, малонового діальдегіду, карбонільних груп протеїнів, креатиніну, натрію, калію, білку, активності тіоредоксинредуктази, цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази та цистеїнамінотрансферази / 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази, швидкість утилізації H<sub>2</sub>S), імуноферментні (рівні галектину-3, каспази-3, IL-1β, альдостерону), електрофізіологічні (чутливість ниркових артерій до вазодилатуючої дії H<sub>2</sub>S), морфологічні та статистичні.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Поглиблені існуючі уявлення щодо молекулярних механізмів захисної дії на нирки метформіну за експериментального цукрового діабету. Встановлено, що H<sub>2</sub>S-сигнальна система в нирках є однією із важливих

молекулярних мішеней через яку реалізується нефропротекторний потенціал метформіну.

Вперше встановлено, що використання метформіну коригує ініційовані цукровим діабетом порушення метаболізму  $H_2S$  в нирках (збільшуються запаси  $H_2S$ , активність  $H_2S$ -синтезуючих ензимів цистатіонін- $\gamma$ -ліази, цистатіонін- $\beta$ -синтази та цистеїнамінотрансферази / 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази, зменшується швидкість деградації  $H_2S$ , посилюється його депонування у формі персульфідів за участі тіоредоксинредуктази), а також зміни чутливості ниркових артерій до вазодилатуючої дії  $H_2S$  (зменшується середньоєфективна концентрація  $H_2S$ ), що супряжено з його гіпоглікемічною активністю.

Засвідчено, що за експериментального цукрового діабету використання метформіну супроводжується покращенням функціонування гломерулярного та тубулярного апаратів нирок (зменшується азотемія, збільшується кліренс креатиніну, показник відносної реабсорбції води), депримує впливом на активність РААС (зменшується секреція альдостерону, збільшується натрійурез та зменшується калійурез), антиоксидантною (зменшується рівні малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів в нирках), антифіброгенною (зменшується рівень галектину-3 в нирках), протизапальною (знижується вміст  $IL-1\beta$  в нирках) та антиапоптотичною (зменшується вміст каспази-3 в нирках) активністю, що тісно асоціюється з його впливом на систему  $H_2S$  в нирках.

Вперше показано, що використання метформіну у поєднанні з  $NaHS$  за цукрового діабету забезпечує більш ефективну корекцію глікемії, розладів метаболізму  $H_2S$  в нирках, порушень функціонування та мікроструктури гломерулярного та тубулярного відділів нефрона, а також посилює антиоксидантний, антифіброгенний, протизапальний та антиапоптотичний ефекти. В той же час застосування пропаргілгліцину зменшує гіпоглікемічний, нефропротекторний потенціал метформіну та його вплив на систему  $H_2S$  в нирках.

### **Практичне значення одержаних результатів**

Результати проведених досліджень розширюють інформацію щодо механізмів фармакологічної активності метформіну та експериментально обґрунтовують доцільність використання донорів  $H_2S$  з метою оптимізації фармакотерапії діабетичної нефропатії. Практичне значення результатів дослідження підтверджується 2 патентами України на корисні моделі (№107765; №107767).

Результати дослідження використовуються в науково-педагогічному процесі кафедр біологічної та загальної хімії, фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова; кафедри біоорганічної та біологічної хімії Полтавського державного медичного університету, кафедри медичної біології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри клінічної медицини навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченка.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота самостійно виконана здобувачем. Дисертантом особисто обрано тему, сформульовано мету та завдання дослідження, розроблено методологію дослідження, проведено пошук й аналіз літературних даних, статистична обробка отриманих результатів та оформлено дисертацію. Основні положення роботи, висновки, практичні рекомендації обговорені з науковим керівником і сформульовані автором самостійно. Всі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі. Оформлення наукових публікацій та патентів виконано здобувачем особисто. Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу в проведенні досліджень, співучасть яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дослідження.** Основні положення дисертації оприлюднені на: 85-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині» (Івано-Франківськ, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання

лабораторної діагностики та медицини сьогодення» (Вінниця, 2016); VIII Lviv - Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Lublin, Poland, 2017); LX науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», присвячена 60-річчю ТДМУ (Тернопіль, 2017); V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 2019), XVI міжнародній конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2019» (Вінниця, 2019), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019); Ist International Scientific-Practical Conference «Scientific Achievements: Projects, Research, Prospects» (Starobilsk, Ukraine, 2020).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 17 наукових праць: 5 статей у наукових фахових виданнях МОН України (категорія Б), 1 стаття у фаховому періодичному іноземному виданні (Австрія), 2 патенти України на корисну модель та 9 тез в матеріалах конгресів та конференцій.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертація представлена українською мовою на 176 сторінках (120 сторінок основного тексту) і складається з анотації, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних літературних джерел (включає 225 найменувань, з них 22 кирилицею, 203 – латиницею) та додатків. Робота ілюстрована 38 рисунками та 21 таблицею.

## РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА РОЛЬ СИСТЕМИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В  
МЕХАНІЗМАХ УРАЖЕННЯ НИРОК ТА НЕФРОПРОТЕКЦІЇ ЗА  
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

## 1.1 Молекулярні механізми розвитку діабетичної нефропатії

Цукровий діабет (ЦД) є неінфекційною епідемією XXI ст. Станом на 2019 рік у світі зареєстровано 463 млн. осіб хворих на ЦД і прогнозується зростання числа пацієнтів приблизно в 1,5 рази до 2045 року [10, 165]. За даними МОЗ в Україні на ЦД хворіють близько 1 млн. 400 тисяч осіб, серед них на інсулінозалежний тип припадає лише 19 %. ЦД посідає третє місце за поширеністю після серцево-судинних захворювань та онкологічних хвороб. Медико-соціальна важливість проблеми ЦД асоціюється також з високим ризиком розвитку ускладнень, які супроводжуються інвалідизацією та смертністю хворих. За даними ВООЗ ЦД супроводжується вкороченням тривалості життя, а також зростанням смертності в 2-3 рази [97]. В Україні приблизно 3 % первинної інвалідності дорослого населення пов'язують з захворюваністю на ЦД. Основними причинами інвалідизації та смертності хворих є розвиток серцево-судинних ускладнень та термінальної ниркової недостатності [97, 186].

До найбільш поширеного мікросудинного ускладнення ЦД належить діабетична нефропатія. За даними літератури ураження нирок розвивається приблизно у 30 % за ЦД 1 типу та у 40 % за ЦД 2 типу [2, 21]. Діабетична хвороба нирок характеризується стійкою альбумінурією, прогресивним зниженням гломерулярної фільтрації, часто асоціюється з підвищенням артеріального тиску та врешті-решт призводить до розвитку уремії [2]. Діабетична нефропатія асоціюється з високою смертністю від серцево-судинної патології та термінальної ниркової недостатності [60, 103]. Висока



поширеність діабетичної нефропатії та смертність від цього ускладнення по більшій мірі пов'язана з невирішеністю питань патогенезу та ефективного лікування.

Патогенез розвитку діабетичної нефропатії є складним, багатофакторним, із залученням різноманітних сигнальних шляхів та медіаторів [156, 185, 194]. Важливими молекулярними та патофізіологічними механізмами ураження нирок за ЦД є наступні: порушення вуглеводного обміну, оксидативний стрес, імунозапальні порушення, індукція фіброзу, апоптозу, гемодинамічні розлади та ін [31, 55, 91, 98, 100, 111, 163, 187, 197].

### ***Порушення вуглеводного обміну.***

Зростання концентрації глюкози в крові є тригерним чинником, який запускає більшість патогенетичних ланок через які реалізується ураження нирок за цукрового діабету. За цих умов відмічається зростання активності поліолового та гексозамінового шляхів, протеїнкінази С та активуються процеси глікації [28, 98, 128, 163].

Активація поліолового шляху [25, 38, 110, 185, 204] супроводжується цілим рядом порушень: 1) зростає вміст фруктози, яка розглядається як потенційний нефротоксин; 2) розвивається дефіцит внутрішньоклітинного НАДФН, що супроводжується порушенням відновлення глутатіону та розвитком оксидативного стресу; 3) збільшується внутрішньоклітинне співвідношення НАДН / НАД<sup>+</sup>, що веде до накопичення диацилгліцеролу та метилгліюксалу, які є попередниками кінцевих продуктів глікування та активують протеїнкіназу С.

Активація гексозамінового шляху [185, 209] викликає накопичення глюкозамін-6-фосфату, який стимулює експресію прозапальних цитокінів – фактору некрозу пухлин альфа (TNF- $\alpha$ ) та трансформуючого фактору росту бета 1 (TGF- $\beta$ 1).

Посилення процесів глікації білків [34, 47, 87, 134, 141, 174, 185, 198] на тлі гіперглікемії викликає накопичення кінцевих продуктів глікації (КПГ), які мають високу реакційну здатність та відносяться до глікотоксинів. До

попередників КПП відносять гліюксаль, метилгліюксаль та продукти розпаду речовин Амадорі. КПП викликають модифікацію та порушення функцій внутрішньоклітинних та позаклітинних білків. За ЦД КПП модифікують ламінін та колаген IV типу, що підвищує проникність базальної мембрани клубочка. На тлі високої концентрації КПП зростає експресія фібронектину, колагенів I та IV типів, що веде до збільшення щільності та розширення позаклітинного матриксу в нирках. Поряд з цим КПП можуть зв'язуватись з різними прозапальними рецепторами, активуючи продукцію прозапальних цитокінів (IL-1, IL-6 та TNF- $\alpha$ ), факторів росту (TGF- $\beta$ 1, ендотеліального фактора росту судин (VEGF), В-субодиниці тромбоцитарного фактора росту (PDGF-B), фактора росту сполучної тканини (CTGF)), а також активних форм кисню (АФК).

Активація протеїнкінази С [40, 77, 185] виникає внаслідок накопичення диацилгліцеролу (кофактор протеїнкінази С) та викликає розвиток діабетичної нефропатії через різноманітні шляхи. На ранніх стадіях активація протеїнкінази С спричиняє зростання кількості нітроген монооксиду та простагландину E2, що сприяє вазодилатації аферентної артеріоли ниркового клубочка і гіперфільтрації. В той же час на пізніх стадіях ЦД спостерігається прогресуючий дефіцит оксиду азоту, який асоціюється з тяжкою протеїнурією, зниженням функції нирок і гіпертензією. Поряд з цим на тлі активації протеїнкінази С збільшуються рівні VEGF, що супряжено з порушенням внутрішньониркового кровотоку, проникності капілярів та має важливе значення у розвитку мікроальбумінурії. Активація протеїнкінази С також підвищує рівні CTGF та TGF- $\beta$ , продукцію фібронектину та колагену IV типу, що сприяє потовщенню базальної мембрани нефрона, накопиченню екстрацелюлярного матриксу та розвитку нефросклерозу.

### ***Оксидативний стрес.***

Розвиток оксидативного стресу є важливим чинником діабетичної нефропатії. Накопичення в нирках АФК на тлі гіперглікемії розвивається внаслідок дефіциту ендogenous антиоксиданту глутатіону, дисбалансу в

системі про- та антиоксидантних ензимів, а також мітохондріальної дисфункції [31, 95, 111, 129].

За діабетичного ураження нирок відмічається зменшення активності антиоксидантних ферментних систем – супероксиддисмутази, каталази та глутатіонредуктази [95, 111; 137]. Вважається, що низька активність вказаних ферментів у нирках є наслідком зниження експресії сіртуїнів та ядерного фактору еритроїдного походження (Nrf2). Поряд з цим за діабетичної нефропатії реєструється дефіцит ендogenous антиоксиданту глутатіону, що обумовлено пригніченням процесу НАДФН-залежного відновлення окисненого глутатіону через високу активність поліолового шляху та низьку активність глутатіонредуктази. Важливість антиоксидантів у патогенезі нефропатії за ЦД підкреслюється також в експериментальних дослідженнях, у яких показано, що використання вітамінів Е, С, цинку та біофлавоноїдів спричиняє зменшення ниркової недостатності та активності запального процесу в нирках за діабету.

Хронічна гіперглікемія за ЦД супроводжується також змінами прооксидантної ферментативної ланки [48, 95, 96, 111]. Діабетична нефропатія асоціюється зі збільшенням активності НАДФН-оксидази, яка забезпечує продукцію супероксидного-аніон радикалу. Вважається, що активація цього ферменту супряжена з високою активністю протеїнкінази С, а також високими рівнями ангіотензину-II, КППГ та TGF- $\beta$ . Використання інгібітору НАДФН-оксидази APX115 показало високу нефропротекторну активність за експериментального діабету і наразі проходять клінічні дослідження у пацієнтів з ЦД II типу. На тлі ЦД також реєструється збільшення активності ще одного прооксидантного ензиму ксантинооксидази, яка забезпечує продукцію активного кисневого деривату гідроген пероксиду, а також сечової кислоти [74, 111, 171, 193]. Показано, що у пацієнтів з ЦД II типу висока активність ксантинооксидази тісно корелює з сироватковим рівнем сечової кислоти, інсулінорезистентністю, ризиком розвитку термінальної ниркової недостатності та є незалежним предиктором серцево-судинних ускладнень.

Використання інгібітора ксантиноксидази фебуксостата зменшувало запалення, оксидативний стрес в нирках, знижувало рівень альбумінурії та посилювало клубочкову фільтрацію.

Важлива роль у розвитку оксидативного стресу за діабетичної нефропатії належить також мітохондріальній дисфункції [26, 31, 204], яка розвивається на тлі тривалої гіперглікемії, викликає порушення повного відновлення молекулярного кисню і супроводжується продукцією супероксидного-аніон радикалу. Застосування мітохондріального протектору еламіпретиду за діабетичної нефропатії покращувало мітохондріальну біоенергетику та зменшувало продукцію АФК.

### ***Імунозапальні порушення.***

Хронічні імунозапальні порушення відіграють ключову роль у розвитку діабетичної нефропатії. Встановлено, що у пацієнтів на діабетичну хворобу нирок в пунктаті нирок відмічається зростання експресії прозапальних цитокінів, хемокінів та факторів росту [26, 82, 194]. Роль окремих імунозапальних факторів у розвитку діабетичного ураження нирок наведено в табл. 1.1.

### ***Індукція фіброгенезу.***

Ключовою ознакою діабетичної нефропатії є розвиток фіброзу нирок, який характеризується накопичення білків позаклітинного матриксу, таких як колагену I і III типу, фібронектину і ламініну в ділянці мезангію та інтерстиції каналців [123, 159, 220]. На ранніх стадіях діабетичної хвороби нирок показано накопичення білків позаклітинного матриксу в мезангіальному просторі, що призводить до появи гломерулярного склерозу. В подальшому відмічається відкладання білків позаклітинного матриксу в інтерстиції каналців і розвивається тубулоінтерстиційний фіброз. Основним медіатором фіброзу в нирках за ЦД є TGF- $\beta$ , який шляхом фосфорилювання активує фактори транскрипції Smad 2-3 [86, 184, 191; 205]. Останні взаємодіють з Smad 4 і утворюється комплекс Smad 2-4, який транслokuється в ядро і стимулює транскрипцію генів, відповідальних за синтез білків позаклітинного матриксу.

Поряд з цим профіброгенна дія TGF- $\beta$  реалізується через активацію фактора росту сполучної тканини (CTGF), який збільшує експресію фібронектину, колагену I, III та IV. Важливу роль у ремоделюванні сполучної тканини в нирках за ЦД відіграють також КПП та ангіотензин-II, їх профіброгенні ефекти реалізуються також через вплив на сигнальну систему Smad 2-4.

Таблиця 1.1

## Роль цитокінів у розвитку діабетичного ураження нирок

Цито-кіни	Стимулятори експресії	Вплив на нирки	Клітини мішені у нирках	Посилання
IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$	Інфламасоми, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B	Порушення клубочкової гемодинаміки, проліферація мезангіоцитів та фібробластів, накопичення екстрацелюлярного матриксу	Мезангіоцити, тубулярний епітелій	[33, 170]
IL-6	Гіперглікемія, КПП, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4	Диференціація макрофагів, синтез фібронектину, екстрацелюлярного матриксу, проліферація мезангіоцитів, тубулоінтерстиційний фіброз, ендотеліальна дисфункція	Мезангіоцити, подоцити, ендотеліоцити, тубулярний епітелій	[68, 177]
IL-18	NF- $\kappa$ B, інфламасоми, каспаза-1	Апоптоз ендотеліоцитів, інфільтрація макрофагів та нейтрофілів	Ендотеліоцити, Тубулярний епітелій	[64, 73]
TNF- $\alpha$	NF- $\kappa$ B	Апоптоз, оксидативний стрес, ендотеліальна дисфункція, інфільтрація макрофагів та нейтрофілів	Мезангіоцити, подоцити, ендотеліоцити, тубулярний епітелій	[59, 75]

### ***Індукція апоптозу.***

ЦД супроводжується індукцією апоптозу подоцитів, пошкодженням клубочків та розвитком гломерулопатії [44, 51, 65, 120]. Основними чинниками, які інтегровані в індукцію апоптозу за ЦД є наступні: оксидативний стрес, посилення експресії білку p53, та високі рівні ангіотензину-II. На тлі оксидативного стресу активні форми кисню ініціюють апоптоз через рецептор-незалежний механізм. Білок p53 та ангіотензин-II можуть активувати зовнішні та внутрішні шляхи апоптозу через вплив на експресію проапоптичних факторів Вах та каспази-3 [65, 66, 119, 155].

### ***Гемодинамічні порушення.***

Розлади ниркової гемодинаміки за ЦД пов'язують з наступними чинниками: 1) активацією ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС); 2) посиленням синтезу ендотеліну-1; 3) зменшенням продукції нітроген монооксиду [139, 152].

Активація РААС за ЦД призводить до підвищення рівня ангіотензину II, який викликає вазоконстрикцію еферентної артеріоли клубочка, розвиток гіперфільтрації в нирках, артеріальної гіпертензії, оксидативного стресу, ендотеліальної дисфункції, індукції апоптозу та фіброзу [31, 32, 118, 133, 144, 150]. Ще одним потужним еферентним вазоконстриктором, рівень якого зростає за діабетичної нефропатії є ендотелін-1 (ЕТ-1), ефекти якого дуже схожі на такі у ангіотензину-II [80, 105, 128, 139, 218]. Поряд з цим за діабетичної хвороби нирок відмічається дефіцит вазодилататора нітроген монооксиду (NO) та зменшення його біодоступності, що супряжено зі зменшення активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази та посиленням окисної деградації NO. Розлади в системі NO в нирках відіграють важливу роль у порушенні гломерулярної фільтрації, розвитку артеріальної гіпертензії, ендотеліальної дисфункції та прогресуванні ниркової недостатності [152, 183].

На основі літературних даних щодо патогенетичних чинників ураження нирок за ЦД нами складена узагальнююча схема (рис. 1.1) на якій представлені основні механізми розвитку діабетичної хвороби нирок.

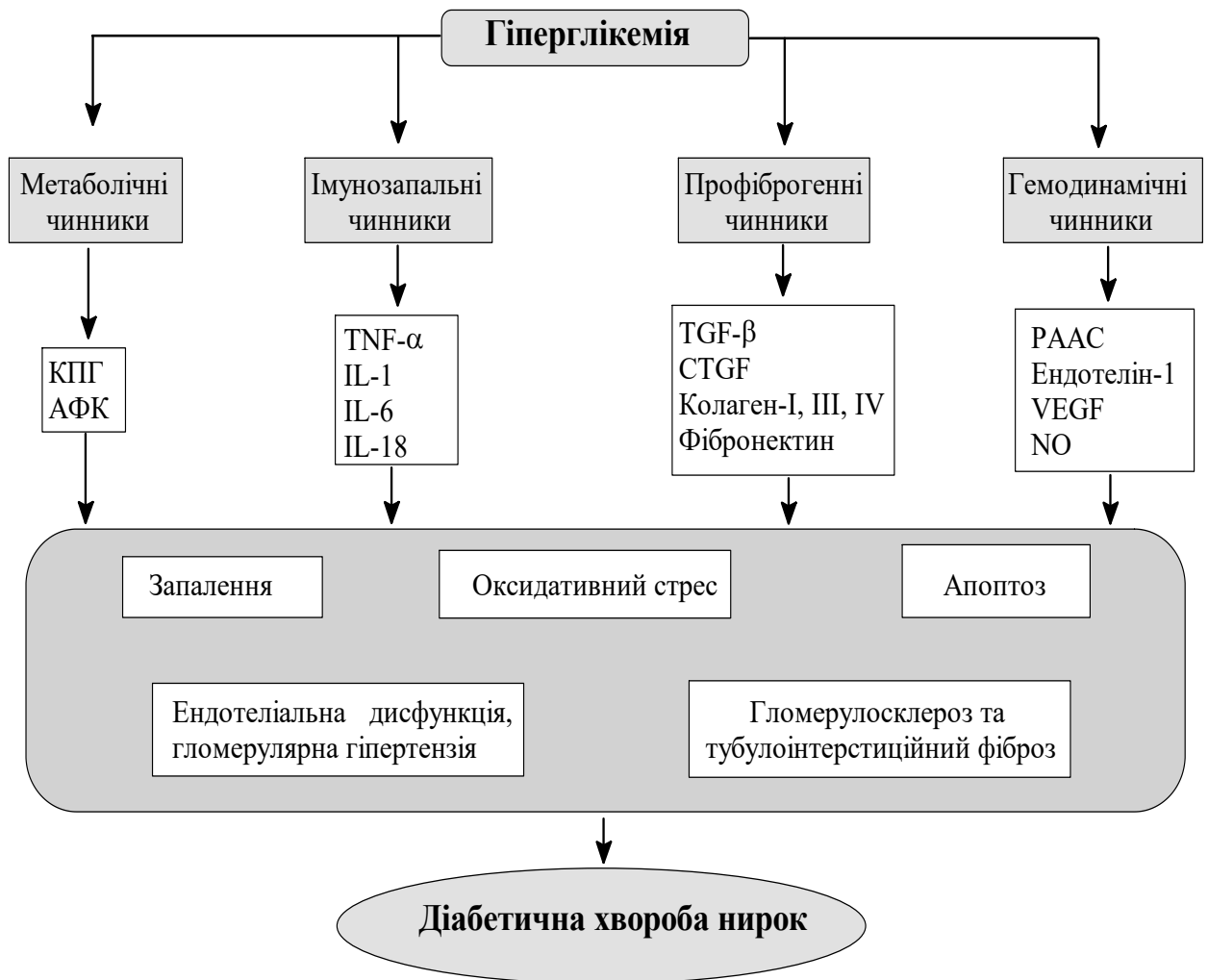


Рис. 1.1 Механізми розвитку діабетичної нефропатії

## 1.2 Метаболізм $H_2S$ в нирках та його біологічне значення

Останні десятиліття присвячені вивченню важливого газотрансмітера гідроген сульфіда ( $H_2S$ ), який залучений до регуляції фізіологічних процесів у тканинах та органах, в тому числі в нирках [79, 127, 146, 148, 154].

*Біосинтез  $H_2S$  в нирках* [36, 43, 79, 101, 143, 181, 208].

Відбувається переважно ензиматичним шляхом за участі трьох піридоксальзалежних ферментів – цистатіонін- $\gamma$ -ліази (ЦГЛ), цистатіонін- $\beta$ -синтази (ЦБС) та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (3-МСТ) (рис. 1.2).

Утворення  $H_2S$  за участі ЦГЛ та ЦБС відбувається в цитоплазмі клітини, тоді як за участі 3-МСТ – в мітохондріях. Показано, що ЦГЛ, ЦБС, 3-МСТ локалізуються у проксимальних канальцях нефрона. Поряд з цим ЦГЛ також міститься в клубочках нефрона, інтерстиції та міждолькових артеріях. Дослідження ниркової експресії вказаних ензимів, показало що найбільшою вона є у ЦГЛ, що свідчить про її провідну роль у синтезі  $H_2S$  в нирках.

ЦГЛ каталізує чотири реакції в ході яких синтезується  $H_2S$ : 1) гідролітичного розщеплення L-цистеїну з утворенням пірувату та амоніаку; 2) гідролізу L-гомоцистеїну з утворенням  $\alpha$ -кетобутирату та амоніаку; 3) конденсації двох молекул L-цистеїну з утворенням лантіоніну; 4) конденсації двох молекул L-гомоцистеїну з утворенням гомолантіоніну. Серед наведених шляхів синтезу  $H_2S$  за участі ЦГЛ основними є перші дві реакції, тоді як роль інших реакцій в нирках ще достатньо не досліджена.

Синтез  $H_2S$  за участі ЦБС відбувається в трьох реакціях: 1) гідролітичного розщеплення L-цистеїну з утворенням серину; 2) конденсації L-гомоцистеїну та L-цистеїну з утворенням цистатіоніну; 3) конденсації двох молекул L-цистеїну з утворенням лантіоніну. Перші реакції, каталізовані ЦБС, є основними продуцентами  $H_2S$  в нирках.

Ензиматичне утворення  $H_2S$  за участі 3-МСТ відбувається в реакції розпаду 3-меркаптопірувату в ході якої вивільняється піруват. Функціонування 3-МСТ тісно асоціюється з мітохондріальним ензимом цистеїнамінотрансферазою (ЦАТ) та пероксисомним ензимом D-амінооксидазою (DAO). В мітохондріях ЦАТ каталізує реакцію трансамінування L-цистеїну та  $\alpha$ -кетоглутарату з утворенням глутамату та 3-меркаптопірувату. Останній є субстратом в реакції утворення  $H_2S$  за участі 3-МСТ. В пероксисомах за участі DAO відбувається окиснення D-цистеїну до 3-меркаптопірувату, який транспортується в мітохондрії та використовується 3-МСТ для синтезу  $H_2S$ . В роботі Shibuya et al. [169] показано, що за використання нирками у якості субстрату D-цистеїну може продукуватись у 60 разів більші кількості  $H_2S$ , ніж за використання L-цистеїну.



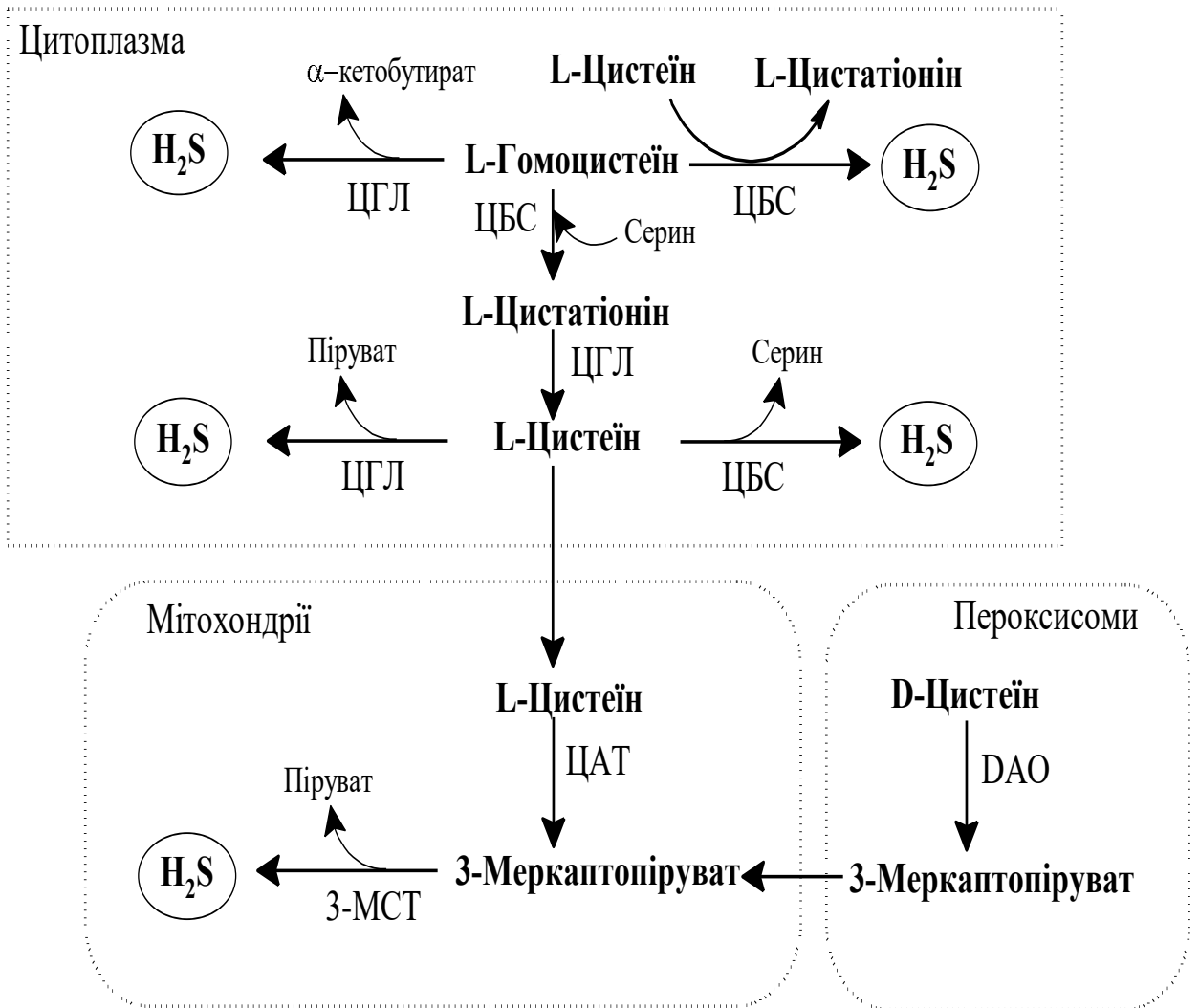


Рис. 1.2 Основні ензиматичні шляхи синтезу H<sub>2</sub>S в нирках

*Катаболізм H<sub>2</sub>S в нирках (рис. 1.3).*

Утилізація H<sub>2</sub>S в нирках відбувається переважно в мітохондріях за участі різних ферментних систем [23, 72, 154]. Розпочинається окиснення H<sub>2</sub>S за участі ферменту сульфід-хінон оксидоредуктази (СХО). Цей фермент каталізує дві реакції: 1) окиснення H<sub>2</sub>S за участі відновленого глутатіону (GSH) та КоQ з утворенням глутатіонперсульфіду (GSSH) і КоQH<sub>2</sub>; 2) окиснення H<sub>2</sub>S за участі сульфат-аніону (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) з утворенням тіосульфат-аніону (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>). В свою чергу S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> може перетворюватись в глутатіонперсульфід за участі GSH та тіосульфатредуктази (ТР). Далі глутатіонперсульфід за участі персульфіддиоксигенази (ПДО) окиснюється з утворенням сульфат-аніону,

який далі може окиснюватись сульфітоксидазою (CO) до сульфат-аніону ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) або відновлюватись тіосульфатсульфуртрансферазою (TCT) в тіосульфат-аніон. Таким чином, продуктом повного окиснення сульфід-аніону ( $\text{S}^{2-}$ ) у складі  $\text{H}_2\text{S}$  є сульфат-аніон.

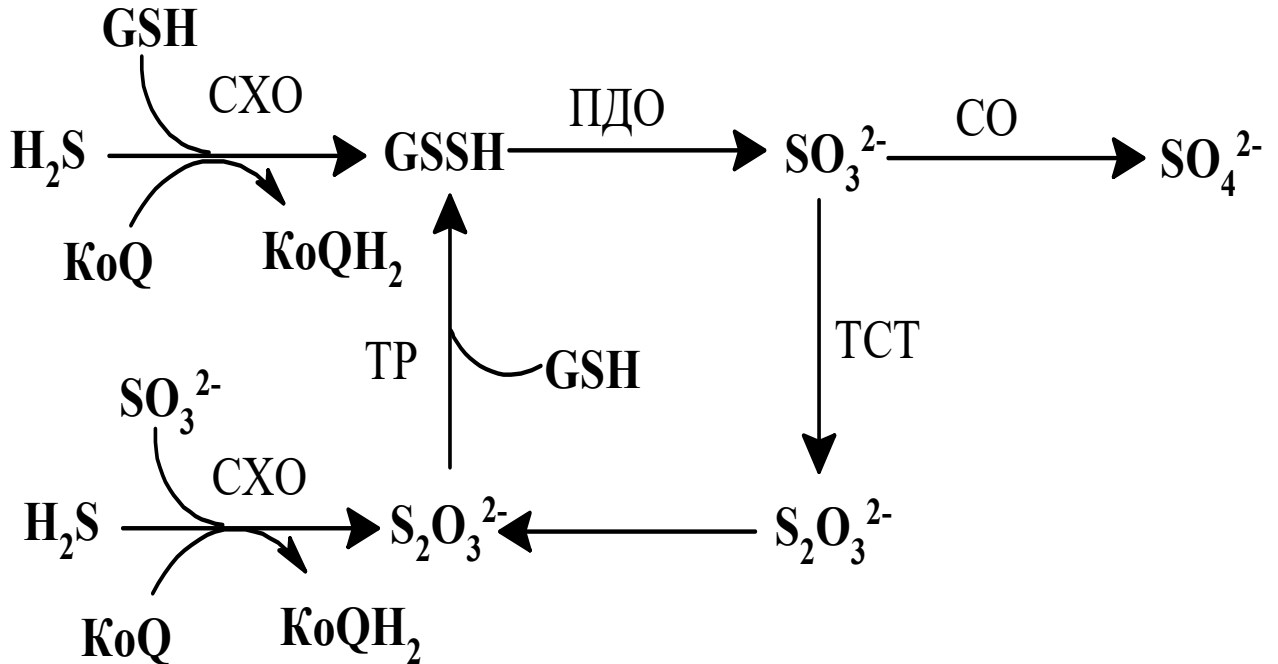


Рис. 1.3 Реакції утилізації  $\text{H}_2\text{S}$  в мітохондріях нирок

#### *Механізми дії $\text{H}_2\text{S}$ .*

Біологічні ефекти  $\text{H}_2\text{S}$  реалізуються через різноманітні механізми:

1) S-сульфгідрування протеїнів [140, 153] – це процес перетворення сульфгідрильних груп ( $-\text{SH}$ ) залишків цистеїну у персульфідні групи ( $-\text{SSH}$ ) за участі  $\text{H}_2\text{S}$ . Він лежить в основі посттрансляційної модифікації багатьох протеїнів, ядерних факторів транскрипції та сигнальних молекул, що супроводжується зміною їх конформації та біологічної активності. Так, S-сульфгідрування АТФ-синтази супроводжується зростанням її активності та посиленням синтезу АТФ, S-сульфгідрування  $\text{K}_{\text{ATP}}$  каналів гладеньких м'язів судин спричиняє їх відкриття та розслаблення стінок судин.

2) Антиоксидантна дія [37, 61, 106, 200].  $\text{H}_2\text{S}$  виявляє прямий антиоксидантний ефект, адже він є сквенжером супероксидного-аніон

радикалу та пероксинітриту. Поряд з цим він виявляє непрямі антиоксидантні активності, які по'язані з S-сульфгідрування сіртуїнів та Nrf2, що супроводжується зростанням їх активності та веде до активації антиоксидантних ензимів.

3) Відновлення катіонів металів у складі простетичних груп металопротеїнів [164, 224]. Показано, що  $H_2S$  викликає відновлення  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$  у складі гемопротеїнів, що супроводжується зміною їх активності – у мітохондріальній цитохромоксидази активність зменшується (пригнічується тканинне дихання), а у розчинній гуанілатциклази активність зростає (ендотелійзалежна вазодилатація).

#### *Фізіологічна роль $H_2S$ в нирках.*

1) Вплив на нирковий кровотік та швидкість клубочкової фільтрації [46, 69, 143, 199]. Встановлено, що інтратренальна артеріальна інфузія донора  $H_2S$  (NaHS) підвищує нирковий кровотік та швидкість клубочкової фільтрації, що пов'язують з більш виразним вазодилатуючим ефектом  $H_2S$  на приносні артеріоли. В той же час застосування інгібіторів синтезу  $H_2S$  пропаргілгліцину та амінооксиацетату супроводжувалось протилежними ефектами – зменшувалась клубочкова фільтрація та нирковий кровотік.

2) Вплив на екскрецію з сечею натрію та калію [76, 143, 199]. Використання NaHS та L-цистеїну (субстрат для синтезу  $H_2S$ ) викликає збільшення натрійурезу та калійурезу, що тісно асоціюється з інгібуванням  $Na^+-K^+-2Cl^-$ -котранспортера та  $Na^+-K^+$ -АТФази. Встановлено, що  $H_2S$  безпосередньо індукує ендцитоз та сприяє інгібуванню  $Na^+-K^+$ -АТФ-ази через сигнальний шлях - фосфатидилінозитол-3-кіназу (PI3K)/протеїнкіназу В (Akt) в епітеліальних клітинах ниркових каналців. Поряд з цим в дослідженнях *in vitro* показано, що  $H_2S$  також пригнічує активність  $Na^+-H^+$  обмінника-3 в епітеліальних клітинах каналців.

3) Вплив на водний баланс та концентрування сечі [126]. В нещодавніх експериментальних дослідженнях встановлено, що використання інгібіторів синтезу  $H_2S$  знижує експресію аквапорину AQP-2 у збірних трубочках та

зменшує концентрування сечі, тоді як введення донорів  $H_2S$  виявляло протилежну дію. Здатність  $H_2S$  стимулювати реабсорбцію води та сприяти концентруванню сечі пояснюють його впливом на сигнальний шлях – цАМФ-залежну протеїнкіназу.

#### 4) Регуляція артеріального тиску.

Регуляторна дія  $H_2S$  на тонус судин реалізується через різноманітні механізми: 1) активацію  $K_{ATP}$  каналів гладеньких м'язів судин [188]; 2) депримуєчий вплив на РААС - інгібування вивільнення реніну, експресії ангіотензинперетворюючого ферменту, рецепторів до ангіонезину  $AT_1$  [29, 88, 125, 126, 182]; 3) вплив на сигнальну систему NO-цГМФ-протеїнкіназу G [30, 45, 54, 104, 142, 176]. Показано, що  $H_2S$  активує ендотеліальну NO-синтазу, інгібує фосфодіестеразу та пригнічує деградацію цГМФ і посилює активність шляху NO-цГМФ. Поряд з цим  $H_2S$  активує розчинну гуанілатциклазу, а також безпосередньо стимулює протеїнкіназу G.

#### 5) $H_2S$ як кисневий індикатор [147, 149, 211]

За достатньої кількості кисню в тканинах, синтезований  $H_2S$  легко утилізується в мітохондріях шляхом окиснення. В той же час за умов гіпоксії зменшується активність процесів окиснення  $H_2S$ , збільшується його рівень в тканинах, що забезпечує енергетичні потреби клітин за дефіциту кисню. Поряд з цим в умовах гіпоксії активується продукція  $H_2S$  в клітинах, що пояснюється зростанням активності  $H_2S$ -синтезуючих ферментів ЦГЛ та ЦБС. Виникає питання щодо механізмів впливу гіпоксії на продукцію  $H_2S$ . На тлі дефіциту кисню відмічається наступні зміни: 1) у активному центрі ЦБС відмічається деоксигенація гемової групи, що веде до інгібування деградації ферменту Lon-протеазою та зростання його активності; 2) зменшується активність гемоксигенази та синтез карбон монооксиду, що веде до зниження активності протеїнкінази G, зменшення фосфорилювання ЦГЛ та збільшення її активності.

### 1.3 Роль $H_2S$ в патогенезі діабетичної нефропатії та нефропротекції

В багатьох експериментальних та клінічних дослідженнях показано важливу роль  $H_2S$ -сигнальної системи в механізмах розвитку діабетичної нефропатії та нефропротекції [27, 52, 62, 63, 157, 179, 190, 206, 210]. Встановлено, що у людей з ЦД II типу сироватковий рівень  $H_2S$  є вірогідно нижчим, ніж у здорових осіб, і він обернено корелює з маркерами ожиріння [94]. У хворих на ЦД, які перебувають на гемодіалізі, поглиблюється дефіцит  $H_2S$  у плазмі крові, що може сприяти розвитку уремичного атеросклерозу [115]. На моделях експериментального ЦД показано, що за діабетичної нефропатії реєструється зниження рівня  $H_2S$  в нирках та зменшення активності  $H_2S$ -синтезуючих ферментів – ЦГЛ та ЦБС, що тісно асоціюється з розвитком тубулярних та гломерулярних порушень [112, 212; 222]. Вищенаведені дані свідчать про вагомий роль дефіциту  $H_2S$  у виникненні та прогресуванні діабетичної хвороби нирок.

Використання донорів  $H_2S$  за експериментального ЦД характеризувалось вираженою нефропротекторною активністю, яка реалізувалась через різні молекулярні та патофізіологічні механізми [178].

*Вплив донорів  $H_2S$  на активність РААС* (рис. 1.4). На моделі реноваскулярної гіпертензії показано, що введення донорів  $H_2S$  зменшувало рівень реніну, що супроводжувалося зниженням внутрішньоклітинного рівня цАМФ [125]. За експериментальної серцевої недостатності застосування донорів  $H_2S$  інгібувало спричинену форсколіном дегрануляцію реніну в тучних клітинах шляхом зниження внутрішньоклітинного рівня цАМФ [122].

Введення  $H_2S$  за експериментальної діабетичної нефропатії супроводжувалось зменшенням експресії ангіотензиногену, ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ), ангіотензину-II та  $AT_1$ -рецепторів до ангіотензину-II [202, 222]. Наведені дані свідчать про інгібуючий вплив  $H_2S$  на активність РААС, що є однією із молекулярних мішеней через яку реалізується антифіброгенна, антиапоптотична,

протизапальна та антигіпертензивна дія донорів  $H_2S$  за діабетичної хвороби нирок [178]

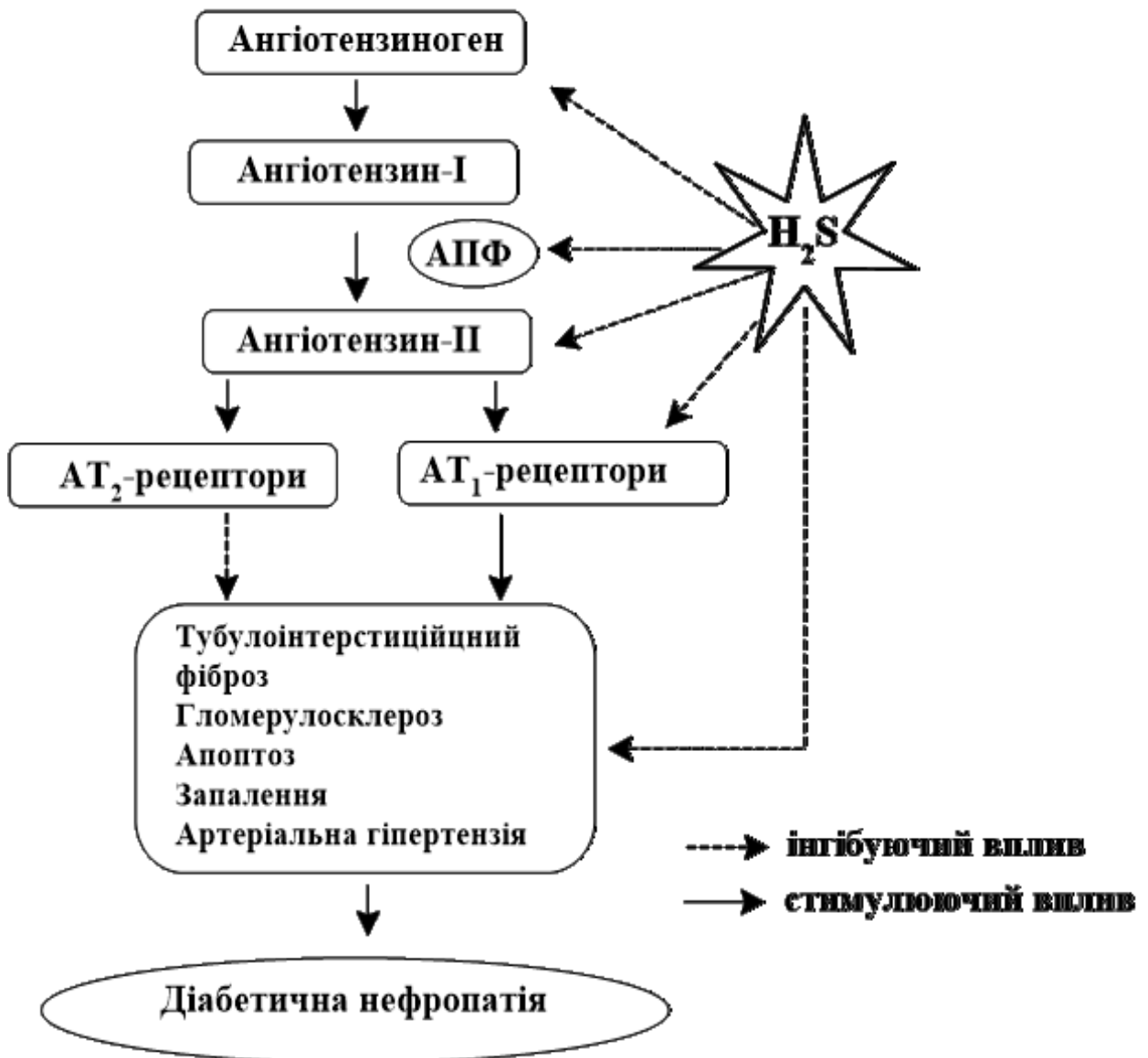


Рис. 1.4 Вплив донорів  $H_2S$  на активність РААС за діабетичної нефропатії

*Вплив донорів  $H_2S$  на оксидативний стрес* (рис. 1.5). Введення донорів  $H_2S$  зменшувало гіперпродукцію АФК в мезангіальних клітинах нирок за ЦД [202, 212]. Поряд з цим  $H_2S$  спричиняв у нирках зростання активності антиоксидантного ензиму СОД та зменшення експресії та активності прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази на тлі експериментального ЦД [112, 207].

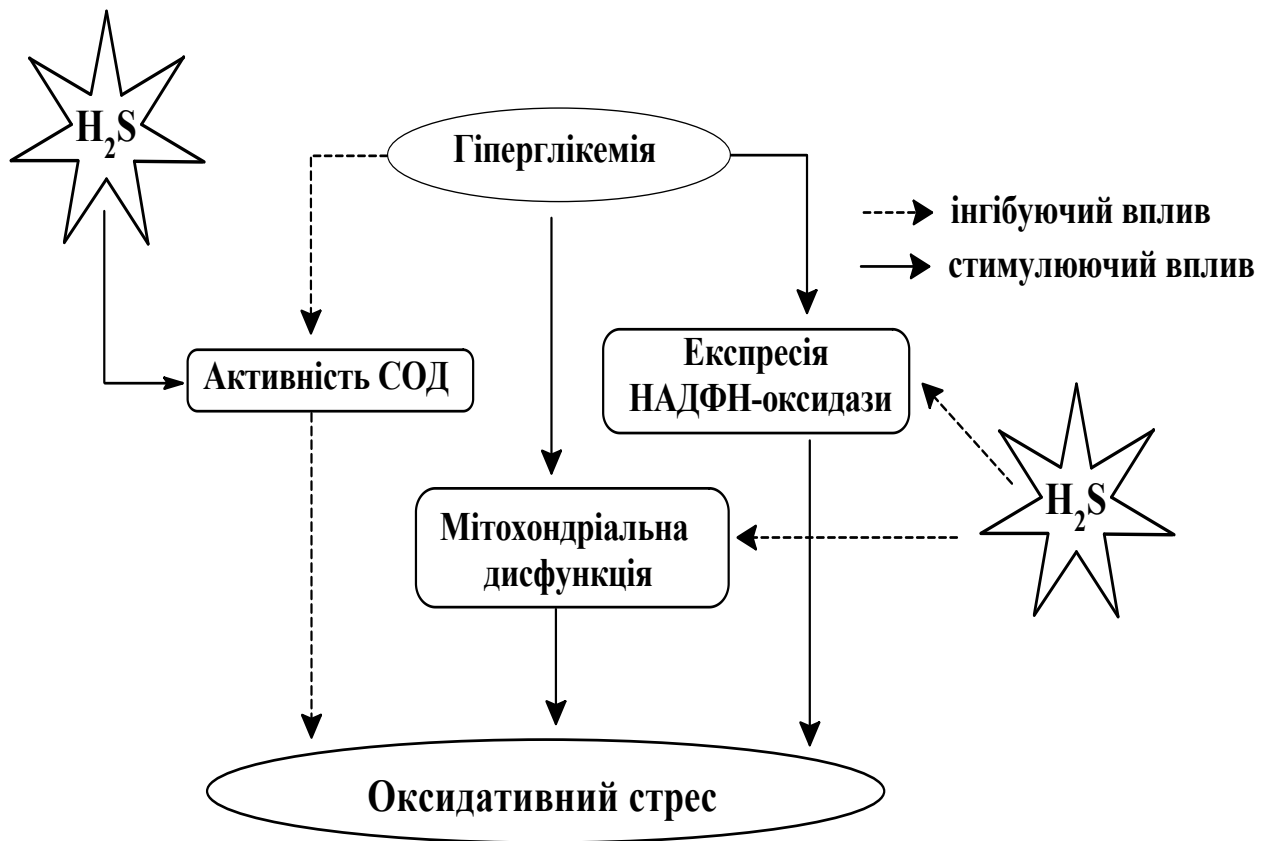


Рис. 1.5 Вплив донорів  $H_2S$  на індукований ЦД оксидативний стрес в нирках

За діабетичної нефропатії та кардіоміопатії використання донорів  $H_2S$  викликало активацію ядерного фактору Nrf2, що супроводжувалось збільшенням експресії антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази в нирках та серці щурів [221, 222]. Також антиоксидантна дія  $H_2S$  реалізується через зменшення мітохондріальної дисфункції, індукованої ЦД [154]

*Вплив донорів  $H_2S$  на активність запального процесу (рис. 1.6).*

Застосування  $H_2S$  виявляло потужну протизапальну дію за експериментального діабетичного ураження нирок, що характеризувалось зменшенням в нирках інфільтрації макрофагами та зниженням експресії прозапальних цитокінів, таких як TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-18 [178, 192]. Протизапальна дія  $H_2S$  реалізується через зменшення експресії ядерного

фактору NF-κB, що обумовлено інгібуючим впливом на прозапальний сигнальний шлях p-38/MAPK [178, 222].

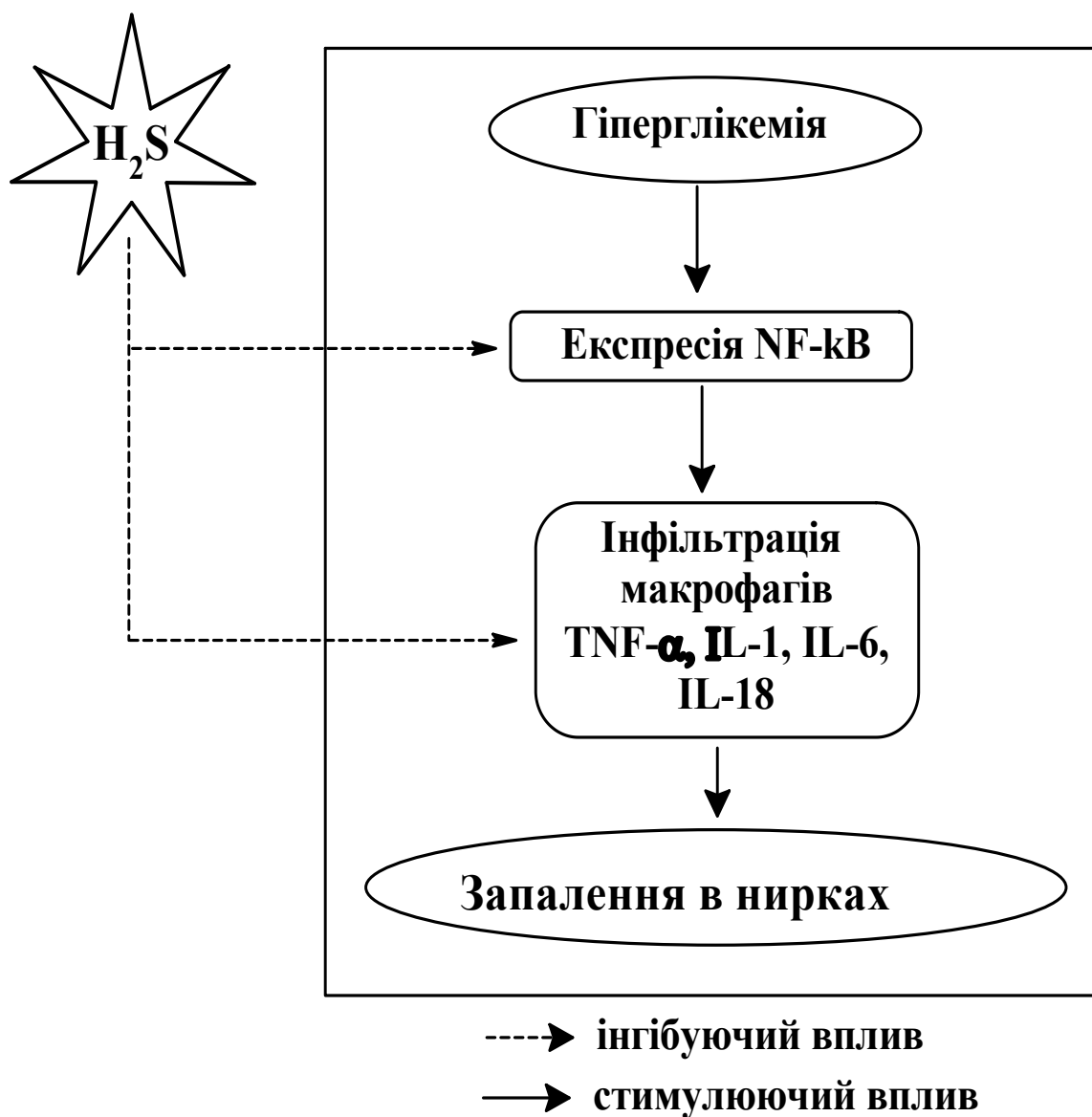


Рис. 1.6 Вплив донорів  $H_2S$  на індуковане ЦД запалення в нирках

*Вплив донорів  $H_2S$  на активність фіброгенезу (рис. 1.7).*

Донори  $H_2S$  зменшують виразність гломерулосклерозу та фіброзу в нирках за ЦД [178]. Показано, що однією із важливих мішеней антифіброгенної дії  $H_2S$  є TGF-β [90]. У щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом введення  $H_2S$  зменшувало експресію TGF-β, знижувався Smad 2-4 сигналінг, що супроводжувалось зниженням експресії білків



екстрацелюлярного матриксу. За цих умов блокувалась трансформація фібробластів у міофібробласти, знижувались рівень фібронектину та колагенів, особливо I типу.

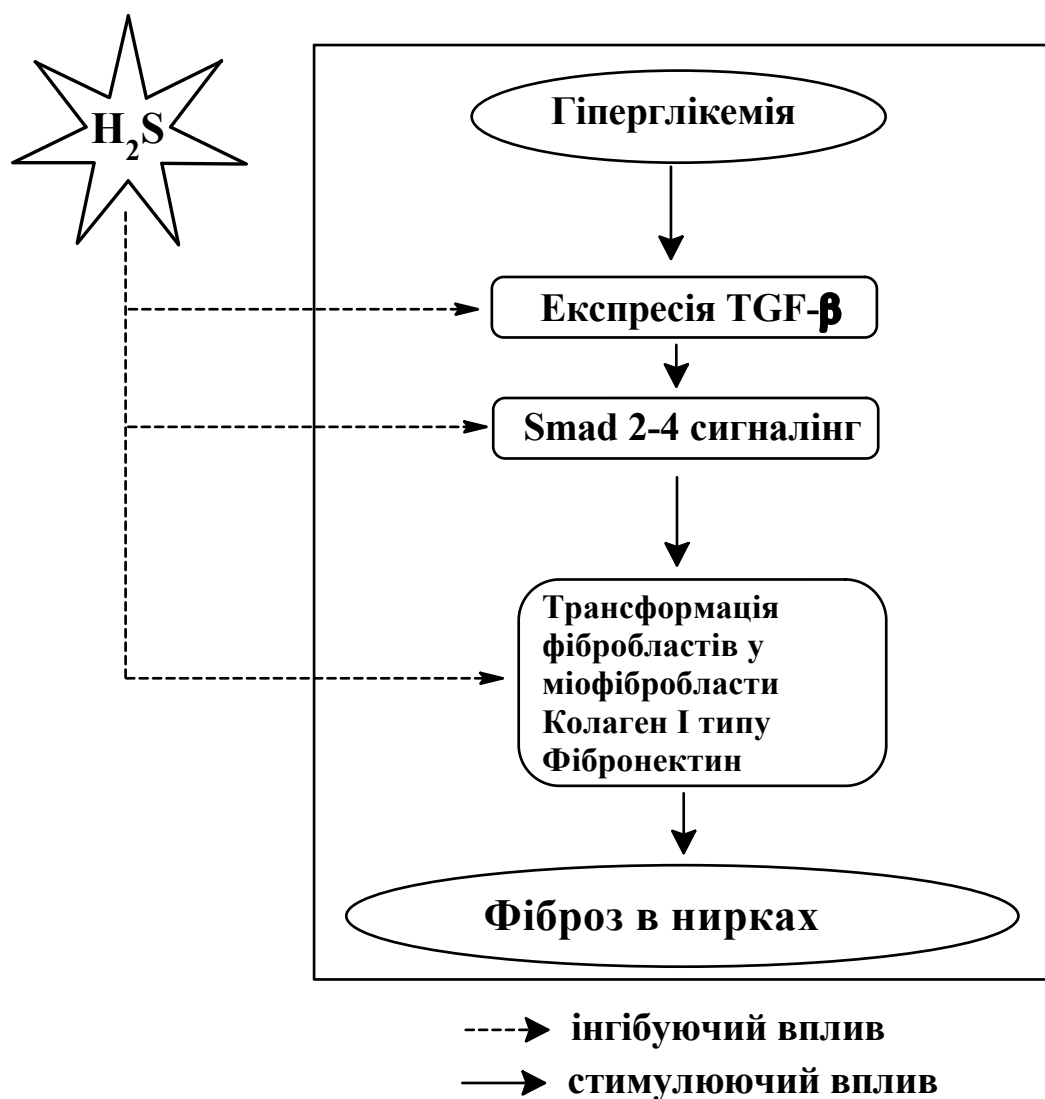


Рис. 1.7 Вплив донорів  $H_2S$  на  $TGF-\beta$ -індукований фіброгенез в нирках за діабетичної нефропатії

Поряд з цим  $H_2S$  збільшує активність протеїнкінази, активованої аденозин-5-монофосфатом, що веде до інгібування ще одного профіброгенного mTOR-сигнального шляху та супроводжується зменшенням позаклітинного матриксу та гіпертрофії нирок [113].

#### 1.4 Роль метформіну в лікуванні діабетичної нефропатії

Препаратом першої лінії в лікуванні цукрового діабету (ЦД) 2 типу є цукрознижуючий засіб із групи бігуанідів метформін [1]. За результатами багатьох клінічних та експериментальних досліджень було встановлено наявність у метформіну потужних нефропротекторних властивостей за ЦД [24, 41, 161, 166, 219]. В крупному проспективному дослідженні (The United Kingdom Prospective Diabetes Study) показано, що тривале використання метформіну у пацієнтів з ЦД 2 типу супроводжується зменшенням ризику розвитку інфаркту міокарду (на 33 %), інсульту (на 20 %) та мікрovasкулярних ускладнень, в тому числі ниркової недостатності (на 16 %) [85]. У пацієнтів з хронічною хворобою нирок та ЦД 2 типу метформін досить добре контролює рівень глікемії, швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) та мікроальбумінурію [102, 132]. В багатьох проспективних клінічних дослідженнях застосування метформіну у пацієнтів з діабетичною нефропатією асоціювалось зі зниженням загальної та кардіо-васкулярної смертності, ризику серцево-судинних ускладнень та розвитку термінальної ниркової недостатності [50, 108, 109, 131].

Останнім часом досить активно вивчаються нефропротекторні властивості метформіну, а саме механізми через які вони реалізуються. Захисна дія метформіну на нирки за діабетичної нефропатії (рис. 1.8) асоціюється з його антиапоптотичною, антиоксидантною, антифіброгенною, протизапальною, ендотеліопротекторною активністю, а також здатністю зменшувати інсулінорезистентність та посилювати екскрецію натрію [102, 180, 203].

*Зменшення інсулінорезистентності та зниження глікемії* на тлі використання метформіну є основним молекулярним механізмом його нефропротекторної активності, адже гіперглікемія та посилення процесів глікації білків є тригерними чинниками, які запускають усі патохімічні механізми ураження нирок за ЦД [108]. Збільшення чутливості тканин до

інсуліну на тлі терапії метформіном опосередковується через активацію сигнального шляху асоційованого з активованою аденозин-5-монофосфатом протеїнкіназою [173].

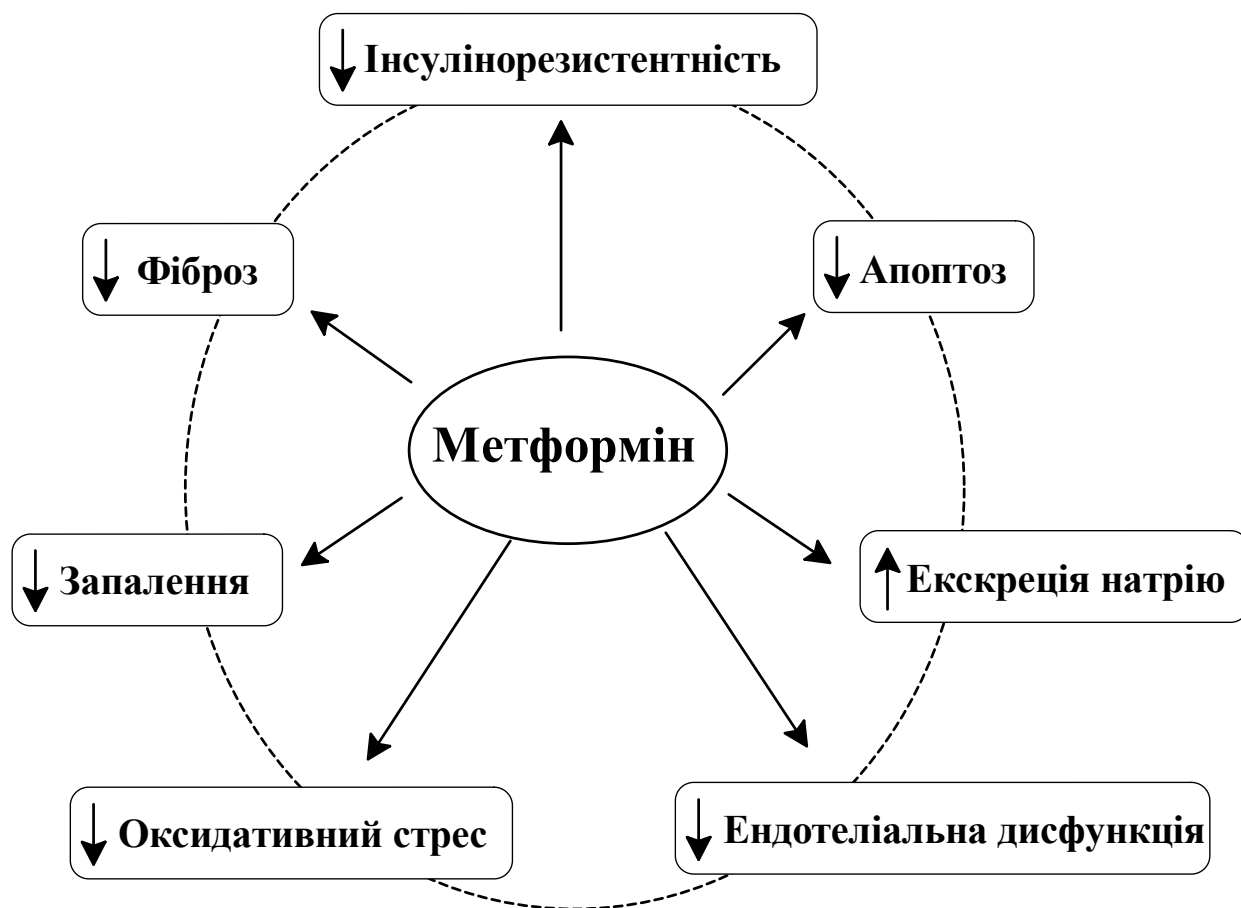


Рис. 1.8 Механізми нефропротекторної дії метформіну за діабетичної нефропатії

*Антифібротична дія метформіну за ЦД* реалізується через різні механізми: 1) стимулювання протеїнкінази, активованою аденозин-5-монофосфатом, що спричиняє пригнічення фіброгенезу через mTOR-сигнальний шлях; 2) зменшення експресії TGF- $\beta$ , AT<sub>1</sub> рецепторів до ангіотензину II, зниження продуктів глікації зменшує активність фіброгенезу через Smad 2-4 сигналінг [56, 67, 71, 89, 138, 189, 203].

*Проти запальна дія метформіну* за ураження нирок різного генезу, в тому числі на тлі ЦД, асоціюється з його здатністю зменшувати експресію

ядерного фактору NF- $\kappa$ B, знижувати продукцію прозапальних цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), а також інгібувати сигнальний шлях, опосередкований STAT-3 (сигнальний білок трансдуктор та активатор транскрипції 3) [53, 145, 214]. Крім того метформін зменшує експресію індукцйбельної ізоформи NO-синтази, що є важливим механізмом його протизапальної активності [56].

*Антиоксидантна дія метформіну* за діабетичної нефропатії характеризується зменшенням продукції АФК та активний форм азоту, збільшенням антиоксидантного потенціалу (зростає активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази), що опосередковується через сигнальний шлях AMPK/SIRT1-FoxO1 (асоційований з протеїнкіназою, активованою аденозин-5-монофосфатом, сїртуїном-1 та фактором транскрипції FoxO1) та зменшення експресії індукцйбельної ізоформи NO-синтази [56, 162].

*Антиапоптотична дія метформіну* асоціюється з його антиоксидантним ефектом, здатністю знижувати експресію ангіотензину-II, зменшувати утворення кінцевих продуктів глікації, а також пов'язана з посиленням інсулінового сигналінгу та збільшенням активності протеїнкінази B [56, 93, 158].

*Ендотеліопротекторна дія метформіну* за діабетичного ураження нирок опосередковується через різноманітні механізми [56, 217]: 1) зменшення активності запалення, оксидативного стресу; 2) відновлення балансу між вазодилататорами та вазоконстрикторами – збільшує синтез вазодилататора NO через активацію ендотеліальної ізоформи NO-синтази, зменшує рівні вазоконстриктора ендотелїну-1, а також зменшує експресію AT<sub>1</sub> рецепторів до вазоконстриктора ангіотензину-II; 3) зниження сироваткових рівнів гомоцистеїну.

*Посилення натрійурезу* на тлі фармакотерапії метформіном пояснюється зниженням активності Na-Cl-котранспортера (зменшується його фосфорилування), а також зменшення експресії та активності Na-каналів у дистальних звивистих каналцях нефрона [83, 167].

Виникає питання щодо причетності системи  $H_2S$  в нирках до реалізації нефропротекторної активності метформіну. В літературі нами знайдено лише дві публікації щодо впливу метформіну на систему  $H_2S$ . Так, за даними Wiliński B. et al. (2013) у інтактних щурів застосування метформіну вірогідно збільшує рівень  $H_2S$  в мозку, серці, нирках та печінці [196]. В роботі Hussain Lodhi A. et al. (2021) показано, що використання метформіну за експериментального ЦД достовірно збільшує запаси  $H_2S$  в нирках [92]. В той же час на сьогодні відсутні літературні дані щодо впливу метформіну на активність  $H_2S$ -синтезуючих ензимів, швидкість його деградації та депонування за цукрового діабету. Невідомо також вплив модуляторів обміну  $H_2S$  на прояви нефропротекторної активності метформіну за діабетичної нефропатії.

### **Резюме до розділу 1.**

В даному розділі узагальнені сучасні дані щодо епідеміології, патогенезу діабетичної нефропатії, а також ролі метформіну у фармакотерапії уражень нирок. Систематизовані нові дані щодо ролі  $H_2S$  в механізмах розвитку та фармакокорекції діабетичної хвороби нирок. Поряд з цим наголошено на відсутності літературних даних про внесок системи  $H_2S$  у нефропротекторну дію метформіну. Вирішенню саме цього актуального питання сучасної медицини присвячена дисертаційна робота.

## РОЗДІЛ 2

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

## 2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей

*Характеристика експериментальних тварини, умов їх утримання та розподіл за серіями експериментів. Біоетичні принципи роботи з тваринами*

Експериментальні дослідження проведені на 125 білих нелінійних щурах-самцях масою тіла 200-240 г. Тварини були отримані з експериментально-біологічної клініки (віварію) ВНМУ імені М.І. Пирогова. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримані етичні принципи експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Законом України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», що було підтверджено комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол №8 від 25.10.2018, протокол №4 від 18.05.2023).

Всі тварини перебували за стандартних умовах віварію при природньому освітленні, сталій температурі та вологості повітря. Експериментальні тварини отримували у вільному доступі воду та гранульований корму відповідно до нормативів. Всі маніпуляції проводили за стандартних умов з 9<sup>00</sup> до 10<sup>00</sup>. При проведенні експериментальних досліджень щоденно контролювали загальний стан тварин, вживання їжі та води, кожні 7 діб визначали масу тіла (статистично достовірно не відрізнялась в усіх дослідних групах). По завершенню експерименту евтаназію тварин проводили методом цервікальної дислокації.

Задля вирішення поставленої мети та завдань дослідження усі піддослідні тварини були розподілені на три серії експериментів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

## Розподіл щурів за серіями експериментів

№№ серій	Напрямки дослідження по серіям	Кількість тварин
1	Дослідження рівня глікемії, показників метаболізму H <sub>2</sub> S в нирках (рівень H <sub>2</sub> S, активність H <sub>2</sub> S-синтезуючих ензимів, швидкості утилізації H <sub>2</sub> S, активності депонування у складі персульфідів), параметрів функціонування нирок, біохімічних маркерів запалення, апоптозу, фіброгенезу й оксидативного стресу в нирках щурів за експериментального цукрового діабету на тлі застосування метформіну та його комбінації з модуляторами обміну H <sub>2</sub> S	75
2	Електрофізіологічні дослідження <i>in vitro</i> H <sub>2</sub> S-індукованої вазодилатації кільцевих фрагментів ниркових артерій щурів за експериментального цукрового діабету на тлі застосування метформіну та його комбінації з модуляторами обміну H <sub>2</sub> S	20
3	Морфологічні дослідження структурної організації нирок щурів за експериментального цукрового діабету на тлі застосування метформіну та його комбінації з модуляторами обміну H <sub>2</sub> S	30
Усього тварин		125

### *Моделювання експериментального цукрового діабету*

Експериментальний цукровий діабет моделювали 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. В такій дозі стрептозоточин викликав стійку гіперглікемію, яка не супроводжувалась діабетичним кетоацидозом [116]. Через 2 доби після ін'єкції стрептозотоцину в периферичній крові щурів визначали рівень глюкози і для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії більше 16 ммоль/л.

### *Застосування метформіну на моделі стрептозоточин-індукованого діабету (СТЦ-діабету)*

З метою антидіабетичної терапії використаний препарат із групи бігуанідів метформін (Берлін-Хемі, Німеччина), який широко використовується для лікування ЦД II, виявляє гіпоглікемічну активністю та поряд з цим володіє нефропротекторними властивостями [1, 102, 132].

Метформін вводили інтрагастрально в дозі 500 мг/кг 1 раз на добу на 1% крохмальному гелі (з розрахунку 1 мл на 100 г маси тіла) з 3 по 28 добу після індукції СТЦ-діабету. Саме в цій дозі метформін найбільш ефективно зменшував сироваткові рівні глюкози та глікозильованого гемоглобіну, що і стало підґрунтям для її вибору [130].

### *Дослідження впливу модуляторів обміну $H_2S$ на нефропротекторні властивості метформіну за СТЦ-діабету*

В якості модуляторів обміну  $H_2S$  були використані наступні: 1) необоротний інгібітор  $H_2S$ -синтезуючого ензиму D,L-пропаргілгліцин (ППГ, Sigma, США); 2) неорганічний донор  $H_2S$  натрій гідрогенсульфід ( $NaHS \cdot H_2O$ , Sigma, США).

Модулятори обміну  $H_2S$  вводили інтраперитонеально 1 раз на добу у відповідних дозах (ППГ - у дозі 442 мкмоль/кг маси,  $NaHS \cdot H_2O$  – у дозі 56 мкмоль/кг) поряд з введенням метформіну з 3 по 28 добу після індукції СТЦ-діабету. Дози, шляхи та тривалість введення модуляторів обміну  $H_2S$  були



запозичені з літератури при проведенні подібних експериментальних досліджень [84].

*Розподіл тварин на групи та дизайн експерименту (табл. 2.2).*

Відповідно до завдань дослідження експериментальні тварини рандомно були розподілені на п'ять груп (по 25 тварини в кожній).

Таблиця 2.2

Розподіл експериментальних тварин за групами та напрямками дослідження

№ групи	Назва групи	Кількість тварин у групі	Напрямки дослідження	Кількість тварин за напрямком досліджень
1.	Контрольна	25	Біохімічні та імуноферментні	n=15
			Електрофізіологічні	n=6
			Морфологічні	n=4
2.	СТЦ-діабет	25	Біохімічні та імуноферментні	n=15
			Електрофізіологічні	n=6
			Морфологічні	n=4
3.	СТЦ-діабет + Метформін	25	Біохімічні та імуноферментні	n=15
			Електрофізіологічні	n=6
			Морфологічні	n=4
4.	СТЦ-діабет + Метформін + NaHS	25	Біохімічні та імуноферментні	n=15
			Електрофізіологічні	n=6
			Морфологічні	n=4
5.	СТЦ-діабет + Метформін + ППГ	25	Біохімічні та імуноферментні	n=15
			Електрофізіологічні	n=6
			Морфологічні	n=4

Перша група – контрольна, отримували еквівалентну кількість розчинників інтрагастрально (з 3 по 28 добу експерименту 1% крохмальний гель 1 раз на добу з розрахунку 1 мл на 100 г маси тіла) та інтраперитонеально (на 1 день експерименту 0,1 М цитратний буфер з рН 4,5, а з 3 по 28 добу

експерименту 0,15 М розчин NaCl, 1 раз на добу з розрахунку 0,1 мл/ 100 г маси). В другій, третій та четвертій та п'ятій групах тварин моделювали цукровий діабет шляхом одноразового інтраперитонеального введення свіжоприготовленого розчину стрептозотоцину. З 3-ої по 28-му добу після інекції стрептозотоцину щурам третьої, четвертої та п'ятої груп вводили інтрагастрально метформін. Щурам 4-ої групи поряд з метформіном вводили донор  $H_2S$  -  $NaHS \cdot H_2O$ , а щурам 5-ої групи поряд з метформіном вводили ППГ. Дози, шляхи та тривалість введення стрептозотоцину, метформіну,  $NaHS$  та ППГ наведені вище.

## 2.2 Біохімічні та імуноферментні методи дослідження

Біохімічні та імуноферментні дослідження виконані на базі сертифікованої МОЗ України науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (свідоцтво про переатестацію №114/21 від 03.09.2021).

### *Отримання проб біологічного матеріалу*

Для біохімічних та імуноферментних досліджень використовували периферичну кров, сироватку крові, сечу та постядерний супернатант гомогенату нирок.

Периферичну кров отримували з кінчика хвоста шляхом нанесення поверхневих насічок з використанням скарифікатора, сироватку крові - центрифугуванням цільної венозної крові при 1500 об/хв протягом 20 хв. Аліквоти сироватки відбирали в мікропробірки Eppendorf і зберігали при температурі  $-20^{\circ}C$ .

Для отримання сечі за 1 добу до завершення експерименту тваринам проводили водне навантаження (інтрагастрально вводили питну воду із розрахунку 1 мл на 100 г маси тіла), далі розміщували в спеціальних клітках і збирали сечу протягом 6 годин. Після цього сечу перемішували та

центрифугували протягом 15 хв при 1500 g, аліквоти відбирали в мікропробірки типу Eppendorf і зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Постядерний супернатант гомогенату нирок отримували двома методами залежно від мети дослідження. З метою оцінки рівня  $\text{H}_2\text{S}$  нирки промивали холодним 1,15% розчином  $\text{KCl}$ , подрібнювали та гомогенізували в середовищі 0,01 М  $\text{NaOH}$  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 зразу ж використовували для досліджень. Для інших досліджень супернатант гомогенату нирок отримували наступним чином: нирки гомогенізували в середовищі 0,25 М сахарози та 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  $4-6^{\circ}\text{C}$  та відбирали аліквоти пост'ядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf.

*Біохімічні дослідження рівня глікемії та показників обміну  $\text{H}_2\text{S}$  в нирках*

Вміст глюкози визначали в периферичній крові щурів з використанням глюкометра Accu-Chek Active (Rouche Group, Німеччина).

Вміст  $\text{H}_2\text{S}$  оцінювали у супернатанті гомогенату нирок спектрофотометричним методом за реакцією утворення метиленового синього в присутності N,N-диметил-пара-фенілендіаміном та  $\text{FeCl}_3$  [195].

Активність  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезуючих ензимів - цистатіонін- $\gamma$ -ліази (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), цистатіонін- $\beta$ -синтази (ЦБС, КФ 4.2.1.22), цистеїнамінотрансферази / 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (ЦАТ / 3-МСТ, КФ 2.6.1.3 / КФ 2.8.1.2) визначали в супернатанті гомогенату нирок за приростом гідроген сульфід у [195]. Для цього використовували адаптовані за складом та активною кислотністю інкубаційні середовища (табл. 2.3), підбирали тривалість та температуру інкубації, що забезпечувало створення оптимальних умов для функціонування  $\text{H}_2\text{S}$ -синтезуючих ензимів [8].

Швидкість утилізації  $H_2S$  визначали у супернатанті гомогенату нирок за зменшенням рівня сульфід-аніону в інкубаційному середовищі, яке містило в кінцевих концентраціях 312 мкМ  $Na_2S$  та 0,47 мМ Трис-НСІ буферу (рН 7,4) [3]. Активність тіоредоксинредуктази (ТРР, КФ 1.8.1.9) в нирках оцінювали за швидкістю відновлення 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоату) (DTNB) у присутності НАДФН з використанням інкубаційного середовища, яке у кінцевих концентраціях містило 0,2 М фосфатний буфер (рН 7,6), 1 мМ ЕДТА, 1 мМ DTNB та 0,25 мМ НАДФН [99].

Таблиця 2.3

Склад інкубаційних середовищ для визначення активності  $H_2S$ -синтезуючих ензимів в нирках щурів

№	Назва ензиму	Склад інкубаційного середовища (кінцеві концентрації)
1	Цистатіонін- $\gamma$ -ліаза (ЦГЛ)	L-цистеїн 3,3 мМ, піридоксальфосфат 0,67 мМ, Трис-НСІ буфер 0,08 М (рН 8,5)
2	Цистатіонін- $\beta$ -синтази (ЦБС)	L-цистеїн 3,3 мМ, D,L-гомоцистеїн 3,3 мМ, піридоксальфосфат 0,67 мМ, Трис-НСІ буфер 0,08 М (рН 8,5)
3	Цистеїнамінотрансфераза / 3-меркаптопіруватсульфур-трансфераза (ЦАТ/3-МСТ)	L-цистеїн 3,3 мМ, $\alpha$ -кетоглутарат 0,825 мМ, піридоксальфосфат 0,67 мМ, Трис-НСІ буфер 0,08 М (рН 8,5)

*Біохімічні дослідження показників функціонування нирок*

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:

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

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

Відносну реабсорбцію води (ВРводи у %) розраховували за формулою:

$$\text{ВРводи} = \frac{\text{Кліренс креатиніну} - \text{ХД}}{\text{Кліренс креатиніну}} \cdot 100 \%;$$

Вміст білку в гомогенаті нирок та сечі визначали за методом Лоурі [124]. Вміст йонів натрію та калію в сечі визначали спектрофотометричним методом за стандартним набором фірми Філісіт-Діагностика, Україна.

Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [136], карбонільних груп протеїнів (КГП) - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [22].

#### *Імуноферментні дослідження*

Рівень альдостерону, галектину-3, каспази-3 та ІЛ-1 $\beta$  визначали імуноферментними методами з використанням відповідних наборів «ALD (Aldosterone) ELISA Kit» («Elabscience Biotechnology Inc.», США), «Rat Galectin 3 (GAL-3) ELISA Kit» (MyBiosource, Cat№ MBS2600708), «Rat Caspase-3 ELISA Kit» («Elabscience Biotechnology Inc.», США), «Rat IL-1 $\beta$  ELISA Kit» («Elabscience Biotechnology Inc.», США) у відповідності до інструкції фірми-виробників. Детекцію проводили на аналізаторі STAT-FAX 303+ (США) при довжині хвилі 450 нм (диференційний фільтр – 630 нм).

### 2.3 Електрофізіологічні методи дослідження

Електрофізіологічні дослідження виконані на базі сертифікованої МОЗ України науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії Вінницького

національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (свідоцтво про переатестацію №049/15 від 02.03.2015).

Оцінку скоротливості кільцевих фрагментів ниркових артерій проводили в режимі, наближеному до ізометричного, з використанням тензометричної установки (створена в ДУ «Інститут фізіології АМН України ім. О.О. Богомольця») за загальноприйнятою методикою [20].

#### *Підготовка ниркових артерій до дослідження*

Ниркові артерії щурів поміщали у розчин Кребса, який містив у кінцевих концентраціях: 132 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,4 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 12,5 мМ  $\text{NaHCO}_3$  та 5,6 мМ глюкози. Показник активної кислотності розчину доводили до рН 7,4 шляхом продування газовою сумішшю, яка містила у об'ємних відсотках - 95%  $\text{O}_2$  та 5%  $\text{CO}_2$ . Ниркові артерії звільняли від сполучної тканини, згустків крові, розрізали на кільцеві фрагменти шириною 2-3 мм та залишали у розчині Кребса при температурі 18-20°C протягом 45 хв.

#### *Хід дослідження*

Фрагменти ниркових артерій розміщали у перфузійній камері, розтягували під постійним навантаженням 15-20 мН, перфузували розчином Кребса ( $t=37^\circ\text{C}$ ) з швидкістю 1,5 мл/хв протягом 40-60 хвилин. Після цього стимулювали гладком'язові клітини гіперкалійним розчином Кребса (містить 80 мМ  $\text{K}^+$ ) для отримання їх стабільних скорочень. Далі фрагменти ниркових артерій тричі по 30 хв промивались стандартним розчином Кребса.

#### *Оцінка цілісності ендотелію ниркових артерій*

Спершу проводили передскорочення ниркових артерій  $\alpha_1$ -агоністом адренорецепторів фенілефрином ( $10^{-6}\text{M}$ ), а далі визначали ступінь їх ізометричного розслаблення під впливом ацетилхоліну ( $10^{-6}\text{M}$ ).

#### *Оцінка $\text{H}_2\text{S}$ -стимульованого розслаблення ізольованих фрагментів ниркових артерій*

Кільцеві фрагменти ниркових артерій передскорочували фенілефрином в концентрації  $10^{-6}\text{M}$  та реєстрували ступінь ізометричного напруження, який

прирівнювали до 100 %. Далі судинні фрагменти послідовно перфузували розчинами, які містили одночасно  $10^{-6}$ М фенілефрину та  $\text{H}_2\text{S}$  в різних концентраціях -  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  та  $10^{-2}$ М (тривалість перфузії з кожною концентрацією  $\text{H}_2\text{S}$  становила 15 хв) і оцінювали рівень їх ізометричного напруження.

Результати досліджень представляли у відсотках, які розраховували відносно показника ізометричного напруження фрагменту ниркових артерій на тлі дії фенілефрину.

*Кваліфікація використаних реактивів:* L-цистеїн,  $\text{NaHS}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , реактив Елмана (DTNB), D,L-пропаргілгілцин, НАДФН, D,L-гомоцистеїн, фенілефрин, ацетилхолін (Sigma, США);  $\alpha$ -кетоглутарат, піридоксальфосфат, N,N-диметил-пара-фенілендіамін сульфат (Fluka, Німеччина), метформін (Сіофор, Берлін-Хемі, Німеччина). Інші реактиви були вітчизняного виробництва категорії х.ч.

## 2.4 Морфологічні дослідження

Гістологічні дослідження проведені на базі Вінницького обласного патолого-анатомічного бюро (ліцензія МОЗ України АЕ № 638623 від 23.04.2015, № 240).

Матеріалом для морфологічних досліджень були фрагменти нирок розміром 1x1 см. Шматочки фіксували в 10 % розчині формаліну - тривалість експозиції становила 1-2 доби. Використання формаліну запобігає аутолізу та водночас стабілізує тканини і забезпечує можливість їх подальшої обробки та використання в процедурах забарвлення. Після фіксації шматочки промивали водою, для видалення надлишку фіксатора, далі проводили зневоднення фіксованого матеріалу у спиртах зростаючої концентрації з метою ущільнення об'єкту та заливали в парафінові блоки. Далі готували напівтонкі зрізи (4-5-мкм) з використанням санного мікротома (МС-2М, Мікромед), а потім забарвлювали їх гематоксиліном і еозином.

Світлооптичне дослідження гістологічних препаратів проводили з використанням світлового мікроскопу Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія) при збільшеннях мікроскопу  $\times 100$  (ок. 10, об. 10) та  $\times 400$  (ок. 10, об. 40). Мікрофотографії виготовляли за допомогою фотокамери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія).

## 2.5 Методи статистичного аналізу

Статистичну обробку отриманих результатів проводили стандартними методами із застосуванням програми «Statistica SPSS 10.0 for Windows» (ліцензійний № 305147890). Отримані результати представляли у вигляді середньої арифметичної ( $M$ ) та середньої похибки середньої ( $M$ ). Поряд з цим вираховували показники медіани та перцентилі ( $P_5$ - $P_{95}$ ). Для перевірки нормальності розподілу користувались критерієм Шапіро-Уїлка. Статистична оцінка достовірності різниці між середніми показниками проводилась з використанням параметричного  $t$ -критерія Стьюдента (за нормального розподілу) та непараметричного  $U$ -критерія Манна-Уїтні (якщо розподіл відхиляється від нормального). З метою дослідження взаємозв'язків між показниками користувались кореляційним аналізом Пірсона та Спірмана. Статистично вірогідними вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

### **Резюме до розділу 2.**

Використані моделі та методи дослідження дозволяють об'єктивно та комплексно розкрити роль системи  $H_2S$  в механізмах нефропротекторної дії метформіну за СТЦ-діабету та на основі цього обґрунтувати нові підходи до фармакокорекції діабетичної нефропатії.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [6, 7].



## РОЗДІЛ 3

СТАН СИСТЕМИ  $H_2S$  В НИРКАХ ТА РІВЕНЬ ГЛІКЕМІЇ НА ТЛІ  
ЗАСТОСУВАННЯ МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЇ З  
МОДУЛЯТОРАМИ ОБМІНУ  $H_2S$  ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО  
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Останні десятиліття присвячені вивченню системи гідроген сульфід (H<sub>2</sub>S) - нового сигнального шляху, залученого до регуляції функціонального стану нирок в нормі та за ЦД [37, 70, 178]. Відомо, що за експериментального ЦД відмічається дефіцит H<sub>2</sub>S в нирках, який тісно корелює з тубуло-гломерулярними порушеннями. Поряд з цим встановлено, що використання донорів H<sub>2</sub>S виявляє нефропротекторний потенціал, тоді як застосування інгібіторів синтезу H<sub>2</sub>S (пропаргілгліцину) – навпаки, поглиблює розвиток діабетичної нефропатії [178]. Залишається не вивченим питання щодо ролі модуляторів обміну гідроген сульфід на ініційовані метформіном зміни рівня глікемії та метаболізму H<sub>2</sub>S в нирках щурів за експериментального ЦД.

Метою даного розділу було оцінити вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну H<sub>2</sub>S на рівень глікемії та метаболізм H<sub>2</sub>S в нирках щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету (СТЦ-діабету). Задля вирішення поставленої мети нами були окреслені наступні завдання дослідження:

1) Оцінити зміни сироваткового рівня глюкози в крові за СТЦ-діабету на тлі застосування метформіну і його комбінації з модуляторами обміну H<sub>2</sub>S.

2) Дослідити вплив метформіну та його поєднання з NaHS і пропаргілгліцином на основні параметри метаболізму H<sub>2</sub>S в нирках за СТЦ-діабету та оцінити можливий зв'язок з рівнем глікемії.

3) Вивчити вплив метформіну та його поєднання з NaHS і пропаргілгліцином на H<sub>2</sub>S-індуковану вазодилатацію ниркових артерій за СТЦ-діабету та оцінити можливий зв'язок з рівнем глікемії

3.1 Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на рівень глюкози в крові, вміст  $H_2S$ , активність  $H_2S$ -синтезуючих ензимів, загальну швидкість утилізації  $H_2S$  в нирках за стрептозотоцин-індукованого діабету.

Застосування метформіну чинить виразну гіпоглікемічну активність за СТЦ-діабету (табл. 3.1). В контрольній групі тварин рівень глюкози в крові коливався в інтервалі 3,85-5,01 ммоль/л ( $P_5$ - $P_{95}$ ), показник медіани становив 4,38 ммоль/л. За СТЦ-діабету реєструвалось вірогідне зростання рівня глікемії в 4,6 рази порівняно з контролем: вміст глюкози в крові перебував у діапазоні 18,4-21,9 ммоль/л ( $P_5$ - $P_{95}$ ), величина медіани становила 20,1 ммоль/л.

Використання метформіну за СТЦ-діабету спричиняло статистично вірогідне зменшення сироваткового рівня глюкози на 25,2 % відносно групи нелікованих тварин. За цих умов вміст глюкози в сироватці крові коливався від 14,0 ммоль/л ( $P_5$ ) до 16,2 ммоль/л ( $P_{95}$ ), показник медіани становив 15,1 ммоль/л.

Таблиця 3.1

Вміст глюкози в сироватці крові у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за дії метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин		Рівень глюкози, ммоль / л	p між групами
1	Контрольна група	4,40±0,12	$p_{1-2} < 0,001$
2	СТЦ-діабет	20,2±0,33	$p_{1-3} < 0,001$
3	СТЦ-діабет + Метформін	15,1±0,21	$p_{2-3} < 0,001$

Примітки:

1. СТЦ-діабет – стрептозотоцин-індукований діабет;
2. нижні індекси біля p вказують на статистичну вірогідність відмінностей показників між відповідними досліджуваними групами.

Модулятори обміну  $H_2S$  модифікували гіпоглікемічну дію метформіну за СТЦ-діабету (рис. 3.1).

Введення екзогенного донору  $H_2S$  (NaHS) потенціувало здатність метформіну зменшувати рівень глюкози в крові за СТЦ-діабету. В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» за середнім показником вміст глюкози в сироватці крові був достовірно меншим на 17,9 % ніж у тварин, лікованих лише метформіном.

Застосування пропаргілгліцину (ППГ) зменшувало гіпоглікемічну активність метформіну за СТЦ-діабету. В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» рівень глюкози в сироватці крові був вірогідно більшим на 23,2 % ніж у тварин, які отримували лише метформін.

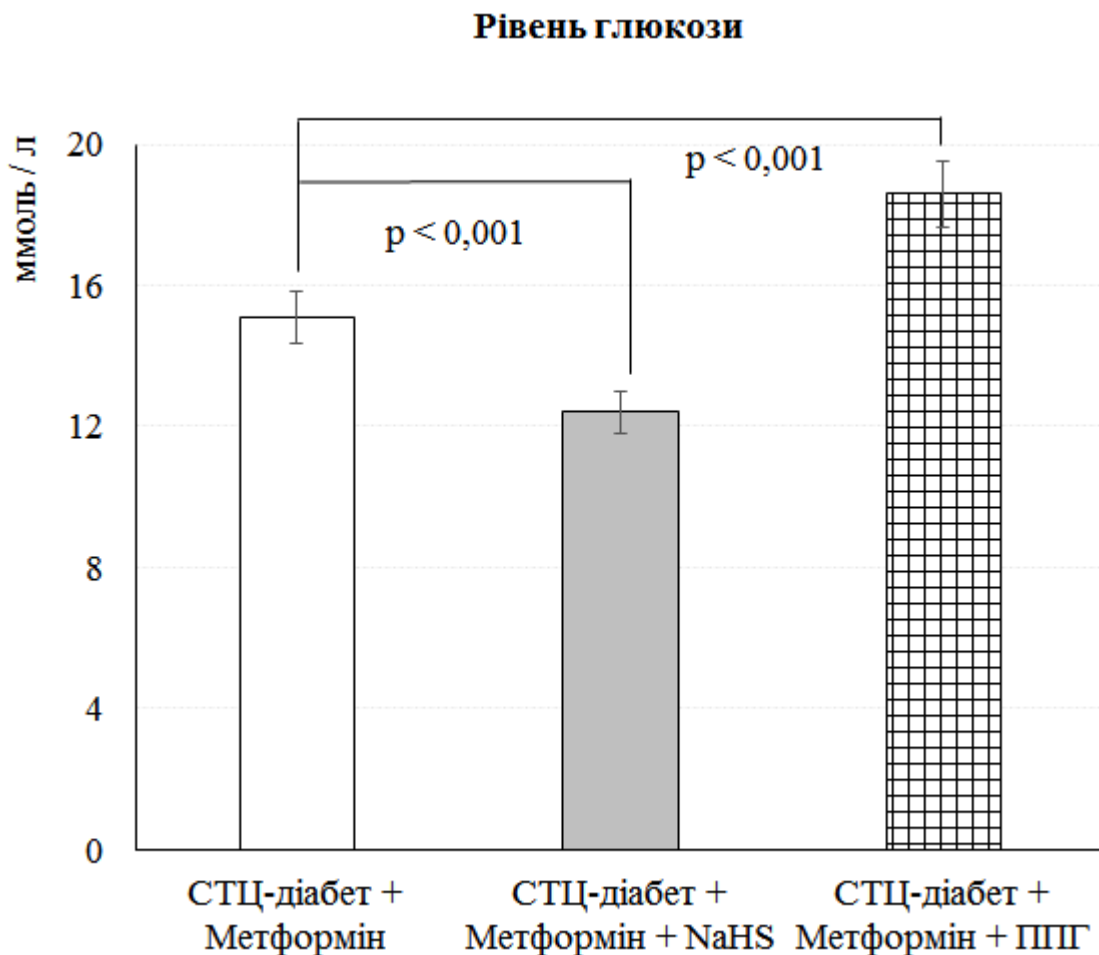


Рис. 3.1 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфідом на індуковані метформіном зміни вмісту глюкози в сироватці крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ).

Фармакотерапія метформіном зменшувала депримуєчий вплив СТЦ-діабету на вміст  $H_2S$  в нирках щурів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вміст  $H_2S$  в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за введення метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	$H_2S$ нмоль / мг протеїну	Кореляція з рівнем глюкози в сироватці крові
Контрольна група	$3,65 \pm 0,12$	$r_s = -0,80$ ( $p < 0,001$ )
СТЦ-діабет	$2,44 \pm 0,10^{***}$	
СТЦ-діабет + Метформін	$3,12 \pm 0,14^{**\&\&\&}$	

Примітки:

- \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ );
- & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (&&& -  $p < 0,001$ );
- статистична достовірність коефіцієнту кореляції Спірмана, розрахована для  $n=45$  ( $p < 0,001$  при  $|r_s| \geq 0,48$ ).

У тварин групи контролю медіана рівня  $H_2S$  в нирках становила 3,73 (95% ДІ 2,89-4,19) нмоль/мг протеїну, а персентильний розмах  $P_{25}$ - $P_{75}$  відповідав діапазону 3,41-3,94 нмоль/мг протеїну. СТЦ-діабет спричиняє формування дефіциту  $H_2S$  в нирках щурів. У групі «СТЦ-діабет» за середнім показником рівень  $H_2S$  в нирках був достовірно меншим на 33,2 % відносно групи контролю: медіана рівня  $H_2S$  в нирках становила 2,54 (95% ДІ 1,86-2,91) нмоль/мг протеїну, а персентильний розмах  $P_{25}$ - $P_{75}$  відповідав діапазону 2,15-2,70 нмоль/мг протеїну.

Введення метформіну вірогідно зменшувало дефіцит  $H_2S$  в нирках щурів, індукований СТЦ-діабетом. У групі «СТЦ-діабет + Метформін» рівень

$H_2S$  в нирках був достовірно більшим на 27,9 % відносно нелікованих тварин: медіана рівня  $H_2S$  – 3,12 (95% ДІ 2,32-3,92) нмоль/мг протеїну, а персентильний розмах  $P_{25}$ - $P_{75}$  – 2,92-3,45 нмоль/мг протеїну. Кореляційний аналіз показав наявність сильного оберненого зв'язку між рівнем глікемії та вмістом  $H_2S$  в нирках щурів, що до певної міри пояснює механізм впливу метформіну на нирковий рівень  $H_2S$

Застосовані модулятори обміну  $H_2S$  змінювали коригуючий вплив метформіну на рівень  $H_2S$  в нирках щурів за СТЦ-діабету (рис. 3.2).

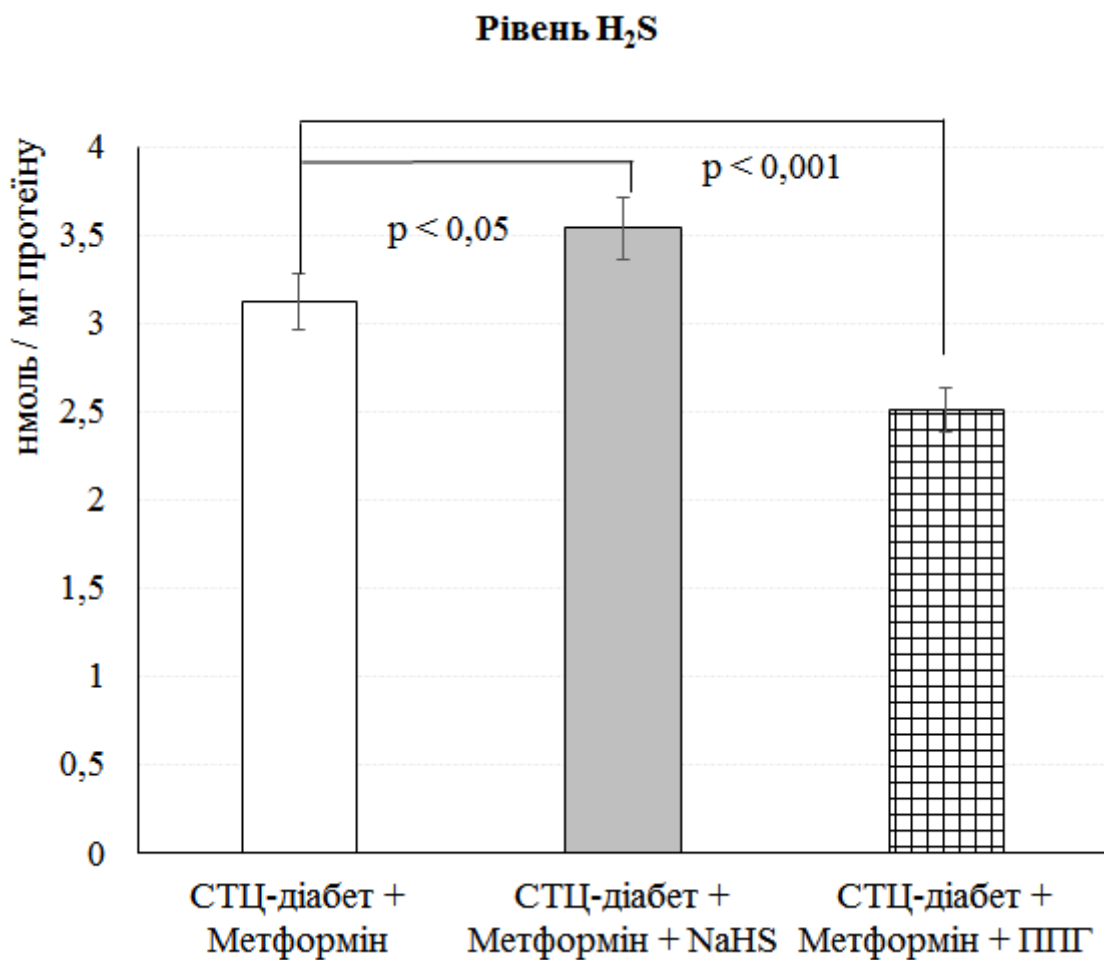


Рис. 3.2 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни вмісту  $H_2S$  в нирках щурів з стрептозотозин-їндукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ).

NaHS посилював здатність метформіну збільшувати запаси ендогенного  $H_2S$  в нирках за СТЦ-діабету. В групі тварин «СТЦ-діабет +

Метформін + NaHS» за середнім показником вміст  $H_2S$  в нирках був достовірно більшим на 13,5 % ніж у тварин, лікованих лише метформіном.

ППГ зменшував коригуючий вплив метформіну на рівень ендогенного  $H_2S$  в нирках за СТЦ-діабету. В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» вміст  $H_2S$  в нирках був вірогідно меншим на 19,5 % ніж у тварин, які отримували лише метформін.

Використання метформіну зменшувало інгібуючий вплив СТЦ-діабету на десульфуразну активність ЦГЛ (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Десульфуразна активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за дії метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	Активність ЦГЛ, нмоль $H_2S$ / хв • мг протеїну	Кореляція з рівнем глюкози в сироватці крові
Контрольна група	1,79 $\pm$ 0,13	$r_s = -0,71$ ( $p < 0,001$ )
СТЦ-діабет	0,750 $\pm$ 0,023***	
СТЦ-діабет + Метформін	1,20 $\pm$ 0,08***&&&	

Примітки:

- \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\*\*\*) -  $p < 0,001$ );
- & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (&&& -  $p < 0,001$ );
- статистична достовірність коефіцієнту кореляції Спірмана, розрахована для  $n=45$  ( $p < 0,001$  при  $|r_s| \geq 0,48$ ).

Встановлено, що у щурів контрольної групи активність синтезу  $H_2S$  за участі ЦГЛ в нирках змінювалась в межах 1,17-2,55 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну ( $P_5$ - $P_{95}$ ), показник медіани становив 1,75 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну.

СТЦ-діабет викликав вірогідне зменшення  $H_2S$ -синтезуючої активності ЦГЛ в нирках на 58,1 % відносно контролю, при цьому показник медіани

становив 0,766 (95 % ДІ 0,599-0,869) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну, а інтерквартильний розмах  $P_{25}$ - $P_{75}$  перебував у діапазоні 0,701-0,803 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну. На тлі використання метформіну за експериментального ЦД реєструвалось статистично вірогідне зростання на 60,0 % десульфуразної активності ЦГЛ в нирках порівняно з нелікованими тваринами. Так, у групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін» перцентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ )  $H_2S$ -синтезуючої активності ЦГЛ в нирках перебував у межах 1,00-1,37 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну, показник медіани становив 1,19 (95 % ДІ 0,773-1,69) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну. За результатами кореляційного аналізу між активністю ЦГЛ в нирках та рівнем глікемії виникав сильний обернений зв'язок, що є додатковим доказом причетності гіпоглікемічної дії метформіну до здатності стимулювати продукцію  $H_2S$  в реакції, каталізованій ЦГЛ.

Використані модулятори обміну  $H_2S$  мали різновекторний вплив на зміни десульфуразної активності ЦГЛ, індуковані метформіном, за експериментального ЦД (рис. 3.3).

За умов використання NaHS реєструвалось посилення активуючого впливу метформіну на десульфуразну активність ЦГЛ в нирках за СТЦ-діабету. Так, в групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» за середнім показником десульфуразна активність ЦГЛ в нирках була статистично достовірно більшою на 38,3 % ніж у тварин, лікованих лише метформіном (показник медіани становив 1,59 (95 % ДІ 1,07-2,25) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну). За цих умов середня величина  $H_2S$ -синтезуючої активності ЦГЛ в нирках вірогідно не відрізнялась від контрольної групи.

Введення ППГ зменшувало стимулюючий вплив метформіну на десульфуразну активність ЦГЛ в нирках за СТЦ-діабету. В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» за середнім показником десульфуразна активність ЦГЛ в нирках була статистично достовірно меншою на 38,7 % ніж у тварин, лікованих лише метформіном (показник медіани становив 0,758 (95 % ДІ 0,622-0,830) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну) та вірогідно не відрізнялась від показника нелікованих тварин з СТЦ-діабетом.

## Активність ЦГЛ

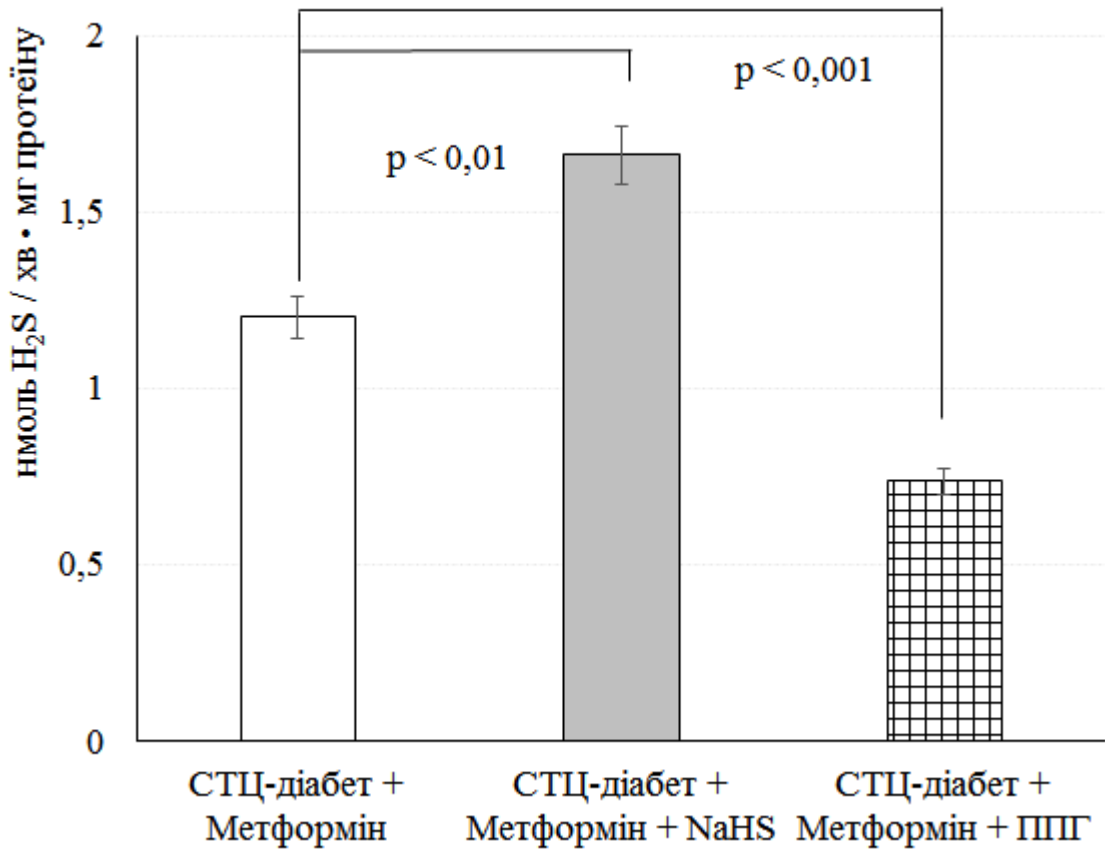


Рис. 3.3 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформіном зміни активності ЦГЛ в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ).

Гіпоглікемічний засіб метформін зменшував депримуєчий вплив експериментального ЦД на продукцію H<sub>2</sub>S в нирках в реакції конденсації цистеїну з гомоцистеїном за участі ЦБС (табл. 3.4).

З'ясувалось, що у контрольній групі тварин медіана десульфуразної активності ЦБС в нирках становила 2,35 (95 % ДІ 1,77-2,78) нмоль H<sub>2</sub>S / хв · мг протеїну, а персентильний розмах P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub> знаходився в межах 2,13-2,50 нмоль H<sub>2</sub>S / хв · мг протеїну.

СТЦ-діабет супроводжувався статистично достовірним зменшенням синтезу H<sub>2</sub>S в реакції за участі ЦБС за середнім показником на 37,8 % відносно контрольної групи тварин; медіана десульфуразної активності ЦБС в нирках



становила 1,50 (95 % ДІ 1,23-1,70) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну, а персентильний розмах  $P_{25}$ - $P_{75}$  знаходився в межах 1,26-1,63 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну.

За умов використання метформіну реєструвалось достовірне зростання десульфуразної активності ЦБС в нирках на 18,6 % відносно нелікованих тварин. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін» медіана десульфуразної активності ЦБС в нирках становила 1,69 (95 % ДІ 1,43-2,07) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну, а персентильний розмах  $P_{25}$ - $P_{75}$  знаходився в межах 1,57-1,87 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну. Дані кореляційного аналізу підтвердили наявність оберненої кореляції середньої сили між рівнем глікемії та десульфуразною активністю ЦБС в нирках. Отримані дані наводять на думку, що гіпоглікемічна дія метформіну є одним із чинників його стимулюючого впливу на продукцію  $H_2S$  за участі ЦБС.

Таблиця 3.4

Десульфуразна активність цистатіонін- $\beta$ -синтази у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за дії метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	Активність ЦБС, нмоль $H_2S$ / хв • мг протеїну	Кореляція з рівнем глюкози в сироватці крові
Контрольна група	2,33 $\pm$ 0,09	$r_s = -0,68$ ( $p < 0,001$ )
СТЦ-діабет	1,45 $\pm$ 0,05***	
СТЦ-діабет + Метформін	1,72 $\pm$ 0,06***&&	

Примітки:

- \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\*\*\*) -  $p < 0,001$ );
- & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (&& -  $p < 0,01$ );
- статистична достовірність коефіцієнту кореляції Спірмана, розрахована для  $n=45$  ( $p < 0,001$  при  $|r_s| \geq 0,48$ ).

Застосовані модулятори обміну  $H_2S$  мали різноспрямований вплив на здатність метформіну посилювати десульфуразну активність ЦБС у нирках за експериментального ЦД (рис. 3.4).

Екзогенний донор  $H_2S$  збільшував метформін-індуковану активацію десульфуразної активності ЦБС. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін +  $NaHS$ » активність синтезу  $H_2S$  в нирках за участі ЦБС була вірогідно більшою на 32,0 % ніж у тварин лікованих лише метформіном та вірогідно не вирізнялась від показника контрольної групи.

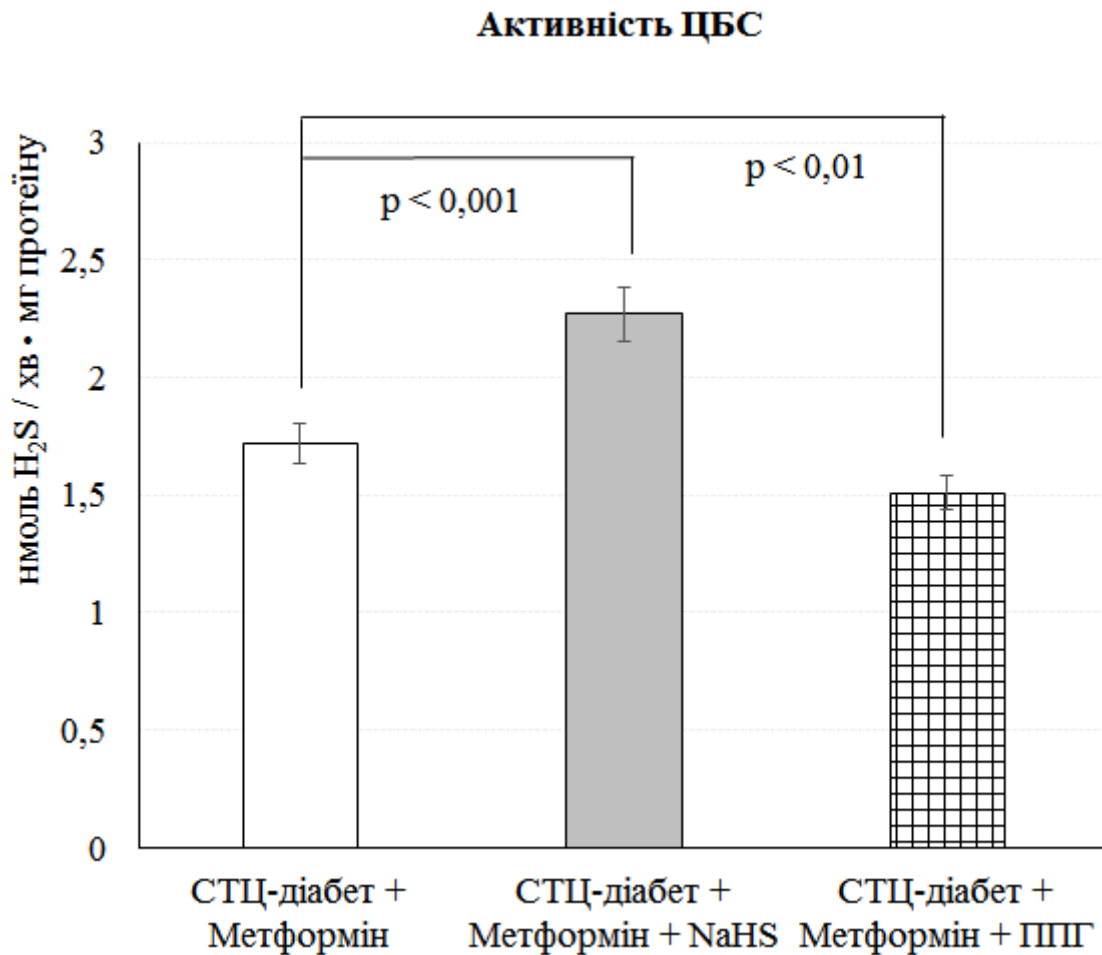


Рис. 3.4 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни активності ЦБС в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ).

Інгібітор синтезу ендogenous  $H_2S$  зменшував ініційовану метформіном активацію десульфуразної активності ЦБС. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» активність синтезу  $H_2S$  в нирках за участі ЦБС була вірогідно меншою на 12,2 % ніж у тварин лікованих лише метформіном та вірогідно не відрізнялась від такого показника у групі тварин з СТЦ-діабет без лікування.

Фармакотерапія метформіном зменшувала інгібуючий вплив СТЦ-діабету на синтез  $H_2S$  в послідовних реакціях, каталізованих ЦАТ та 3-МСТ (табл. 3.5).

Виявилось, що у щурів контрольної групи активність синтезу  $H_2S$  за участі ЦАТ / 3-МСТ в нирках змінювалась в межах 1,80-3,23 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну ( $P_5$ - $P_{95}$ ), показник медіани становив 2,57 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну.

СТЦ-діабет викликав вірогідне зменшення  $H_2S$ -синтезуючої активності ЦАТ / 3-МСТ в нирках на 45,3 % відносно контролю, при цьому показник медіани становив 1,43 (95 % ДІ 1,02-1,75) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну, а інтерквартильний розмах  $P_{25}$ - $P_{75}$  перебував у діапазоні 1,20-1,56 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну.

На тлі використання метформіну за експериментального ЦД реєструвалось статистично вірогідне зростання на 27,9 % десульфуразної активності ЦАТ / 3-МСТ в нирках порівняно з нелікованими тваринами. Так, у групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін» персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ )  $H_2S$ -синтезуючої активності ЦАТ / 3-МСТ в нирках перебував у межах 1,51-2,09 нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну, показник медіани становив 1,74 (95 % ДІ 1,38-2,27) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну. За результатами кореляційного аналізу між активністю ЦАТ / 3-МСТ в нирках та рівнем глікемії виникав сильний обернений зв'язок, що може свідчити про асоціацію між гіпоглікемічною дією метформіну та його здатності стимулювати продукцію  $H_2S$  в реакції, каталізованій ЦАТ / 3-МСТ.

Десульфуразна активність цистеїнамінотрансферази / 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за дії метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	Активність ЦАТ / 3-МСТ, нмоль $H_2S$ / хв • мг протеїну	Кореляція з рівнем глюкози в сироватці крові
Контрольна група	$2,56 \pm 0,13$	$r_s = -0,75$ ( $p < 0,001$ )
СТЦ-діабет	$1,40 \pm 0,07^{***}$	
СТЦ-діабет + Метформін	$1,79 \pm 0,09^{**\&\&\&}$	

Примітки:

1. \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ );
2. & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (&&& -  $p < 0,001$ );
3. статистична достовірність коефіцієнту кореляції Спірмана, розрахована для  $n=45$  ( $p < 0,001$  при  $|r_s| \geq 0,48$ ).

Застосовані модулятори обміну  $H_2S$  мали різнонаправлений вплив на індуковані метформіном зміни десульфуразної активності ЦАТ / 3-МСТ за експериментального ЦД (рис. 3.5).

За використання  $NaHS$  було зафіксовано потенціювання активуючого впливу метформіну на десульфуразну активність ЦАТ / 3-МСТ в нирках за СТЦ-діабету. Так, в групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін +  $NaHS$ » за середнім показником десульфуразна активність ЦАТ / 3-МСТ в нирках була статистично достовірно більшою на 30,2 % ніж у тварин, лікованих лише метформіном (показник медіани становив  $2,31$  (95 % ДІ  $1,75-2,85$ ) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну). За цих умов експерименту середня величина  $H_2S$ -синтезуючої активності ЦАТ / 3-МСТ в нирках вірогідно не відрізнялась від контрольної групи.

Введення ППГ супроводжувалось зниженням стимулюючого впливу метформіну на десульфуразну активність ЦАТ / 3-МСТ в нирках за СТЦ-діабету. В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» за середнім показником десульфуразна активність ЦАТ / 3-МСТ в нирках була статистично достовірно меншою на 16,2 % ніж у тварин, лікованих лише метформіном (показник медіани становив 1,50 (95 % ДІ 1,23-1,74) нмоль  $H_2S$  / хв • мг протеїну) та вірогідно не відрізнялась від показника нелікованих тварин з СТЦ-діабетом.

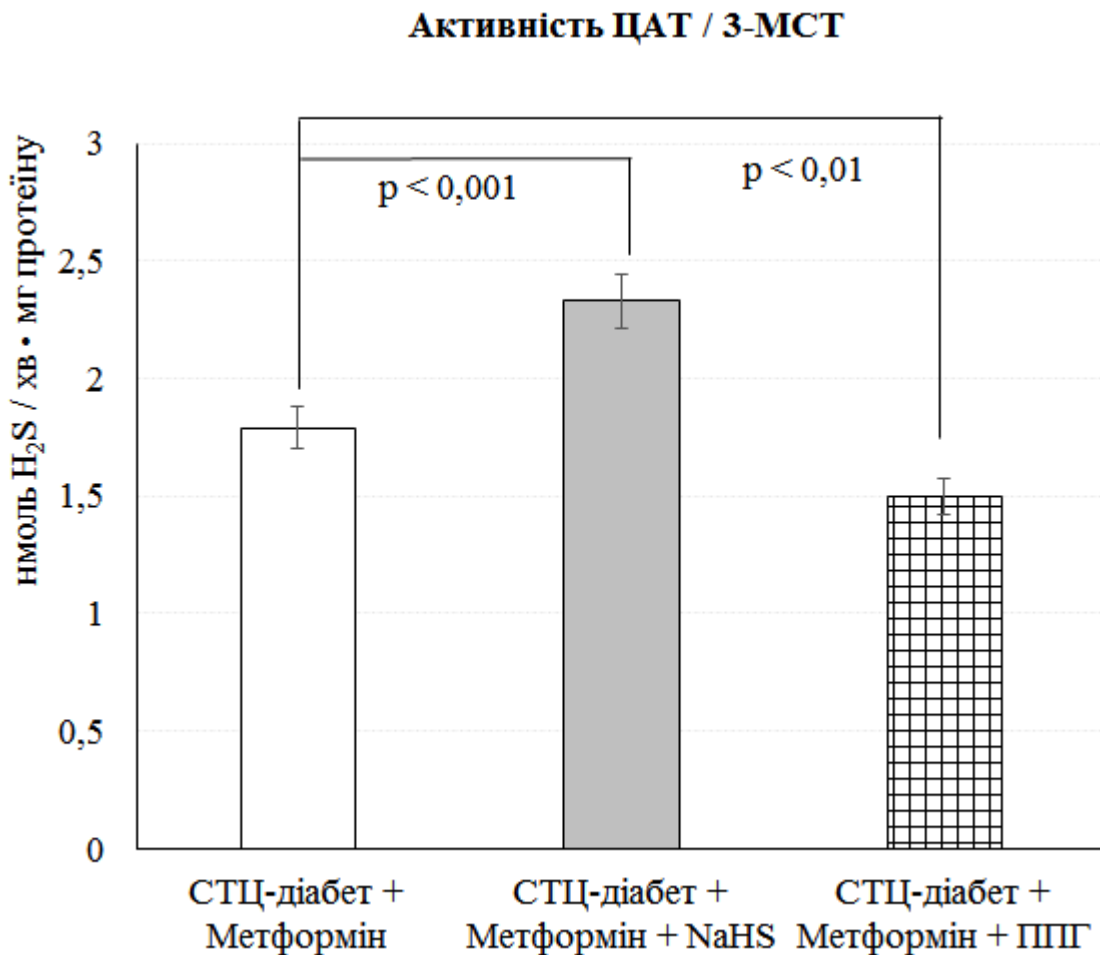


Рис. 3.5 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформіном зміни активності ЦАТ / 3-МСТ в нирках щурів з стрептозоточин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ).

Використання метформіну сповільнює утилізацію  $H_2S$  в нирках щурів за СТЦ-діабету (табл. 3.6).

У щурів групи контролю персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) показника швидкості утилізації  $H_2S$  в нирках щурів відповідав діапазону 0,622-0,832 нмоль  $S^{2-}/xв \cdot мг$  протеїну, величина медіани дорівнювала 0,709 (95 % 0,497-0,942) нмоль  $S^{2-}/xв \cdot мг$  протеїну.

Розвиток СТЦ-діабету супроводжувався вірогідним прискоренням утилізації  $H_2S$  в нирках щурів на 79,4 % відносно контролю. У групі тварин «СТЦ-діабет» персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) показника швидкості утилізації  $H_2S$  в нирках щурів відповідав діапазону 0,989-1,55 нмоль  $S^{2-}/xв \cdot мг$  протеїну, а величина медіани дорівнювала 1,39 (95 % 0,935-1,70) нмоль  $S^{2-}/xв \cdot мг$  протеїну.

Таблиця 3.6

Швидкість утилізації  $H_2S$  в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за дії метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	Швидкість утилізації $H_2S$ , нмоль $S^{2-}/xв \cdot мг$ протеїну	Кореляція з рівнем глюкози в сироватці крові
Контрольна група	0,730 $\pm$ 0,04	$r_s = 0,65$ ( $p < 0,001$ )
СТЦ-діабет	1,31 $\pm$ 0,08***	
СТЦ-діабет + Метформін	0,882 $\pm$ 0,063* $\&\&\&$	

Примітки:

- \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ );
- & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом ( $\&\&\&$  -  $p < 0,001$ );
- статистична достовірність коефіцієнту кореляції Спірмана, розрахована для  $n=45$  ( $p < 0,001$  при  $|r_s| \geq 0,48$ ).

Введення метформіну за СТЦ-діабету викликало статистично достовірне зменшення швидкості утилізації  $H_2S$  в нирках щурів на 32,7 % порівняно з величиною нелікованих тварин, при цьому показник перцентильного розмаху ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) відповідав діапазону 0,715-1,06 нмоль  $S^{2-}$ /хв·мг протеїну, а медіана дорівнювала 0,863 (95 % 0,529-1,24) нмоль  $S^{2-}$ /хв·мг протеїну. Кореляційний аналіз показав існування середньої сили прямого зв'язку між рівнем глікемії та швидкістю утилізації  $H_2S$ , що засвідчує про існування асоціації між зниженням вмісту глюкози та сповільненням утилізації  $H_2S$  в нирках на тлі терапії метформіном.

Модулятори обміну  $H_2S$  відрізнялись за впливом на ініційовані метформіном зміни швидкості утилізації  $H_2S$  за СТЦ-діабету (рис. 3.6).

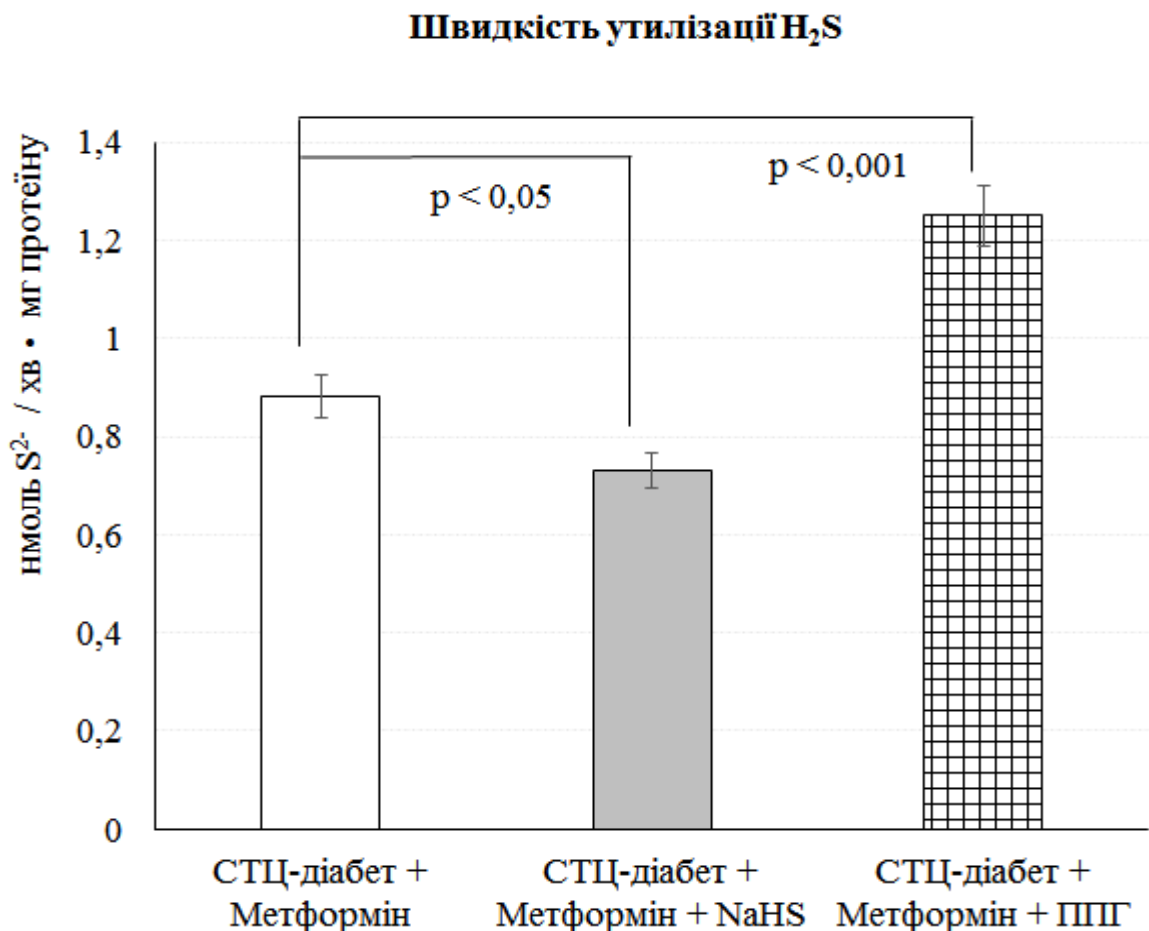


Рис. 3.6 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформіном зміни швидкості утилізації  $H_2S$  в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ).

Застосування NaHS потенціювало інгібуючий вплив метформіну на швидкість утилізації  $H_2S$  в нирках щурів. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» середній показник швидкості утилізації  $H_2S$  в нирках щурів був статистично достовірно меншим на 16,1 % ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном, та вірогідно не відрізнявся від контрольної групи.

Використання ППГ нівелювало депримууючий вплив метформіну на швидкість утилізації  $H_2S$  в нирках щурів. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» за середнім показником швидкості утилізації  $H_2S$  в нирках щурів була статистично достовірно більшою на 41,7 % ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном, та вірогідно не відрізнявся від групи нелікованих тварин з експериментальним ЦД.

Фармакотерапія метформіном за експериментального ЦД супроводжувалась посиленням депонування  $H_2S$  у вигляді персульфідів у нирках щурів за участі TRP (рис. 3.7).

Встановлено, що в контрольній групі показник медіани активності TRP в нирках становив 4,63 (95 % ДІ 3,76-5,66) нмоль DTNB /хв·мг протеїну, а інтерквартильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) знаходився в інтервалі 4,23-5,22 нмоль DTNB /хв·мг протеїну.

Експериментальний ЦД викликав вірогідне зменшення середнього показника активності TRP в нирках на 38,8 % порівняно з контролем; показник медіани становив 3,00 (95 % ДІ 2,20-3,56) нмоль DTNB /хв·мг протеїну, а інтерквартильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) – 2,49-3,27 нмоль DTNB /хв·мг протеїну.

Медикаментозна терапія СТЦ-діабету метформіном спричиняла достовірне зростання середнього показника активності TRP на 15,2 % відносно такого у нелікованих тварин. За цих умов величина медіани активності TRP в нирках становила 3,26 (95 % ДІ 2,59-4,11) нмоль DTNB /хв·мг протеїну, а інтерквартильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) перебував у межах 2,93-3,76 нмоль DTNB /хв·мг протеїну. Між рівнем глікемії та активністю TRP в нирках виявлено помірної сили обернені кореляції, що засвідчує про вагому роль



гіпоглікемічної дії метформіну у прискоренні депонуванні  $H_2S$  за експериментального ЦД.

Таблиця 3.7

Активність тіоредоксинредуктази в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за дії метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	Активність ТРР, нмоль DTNB /хв·мг протеїну	Кореляція з рівнем глюкози в сироватці крові
Контрольна група	4,72±0,17	$r_s = -0,60$ ( $p < 0,001$ )
СТЦ-діабет	2,89±0,13***	
СТЦ-діабет + Метформін	3,33±0,14* $\&\&\&$	

Примітки:

1. \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ );
2.  $\&$  - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом ( $\&\&\&$  -  $p < 0,001$ );
3. статистична достовірність коефіцієнту кореляції Спірмана, розрахована для  $n=45$  ( $p < 0,001$  при  $|r_s| \geq 0,48$ ).

Застосовані модулятори обміну  $H_2S$  на тлі експериментального ЦД мали різновекторний вплив на зміни швидкості депонування  $H_2S$  в нирках, індуковані метформіном (рис. 3.7).

На тлі використання екзогенного донору гідроген сульфід у посилювався активуючий вплив метформіну на швидкість депонування  $H_2S$  у формі персульфідів в нирках за СТЦ-діабету. Виявилось, що в групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін +  $NaHS$ » за середнім показником активність ТРР в нирках була статистично достовірно більшою на 27,6 % ніж у тварин з ЦД, які отримували монотерапію метформіном (показник медіани становив 4,11 (95 % ДІ 3,70-4,77) нмоль DTNB /хв·мг протеїну). Поряд з цим середній показник

активності TRP в нирках статистично вірогідно не відрізнявся від такого у контрольній групі щурів.

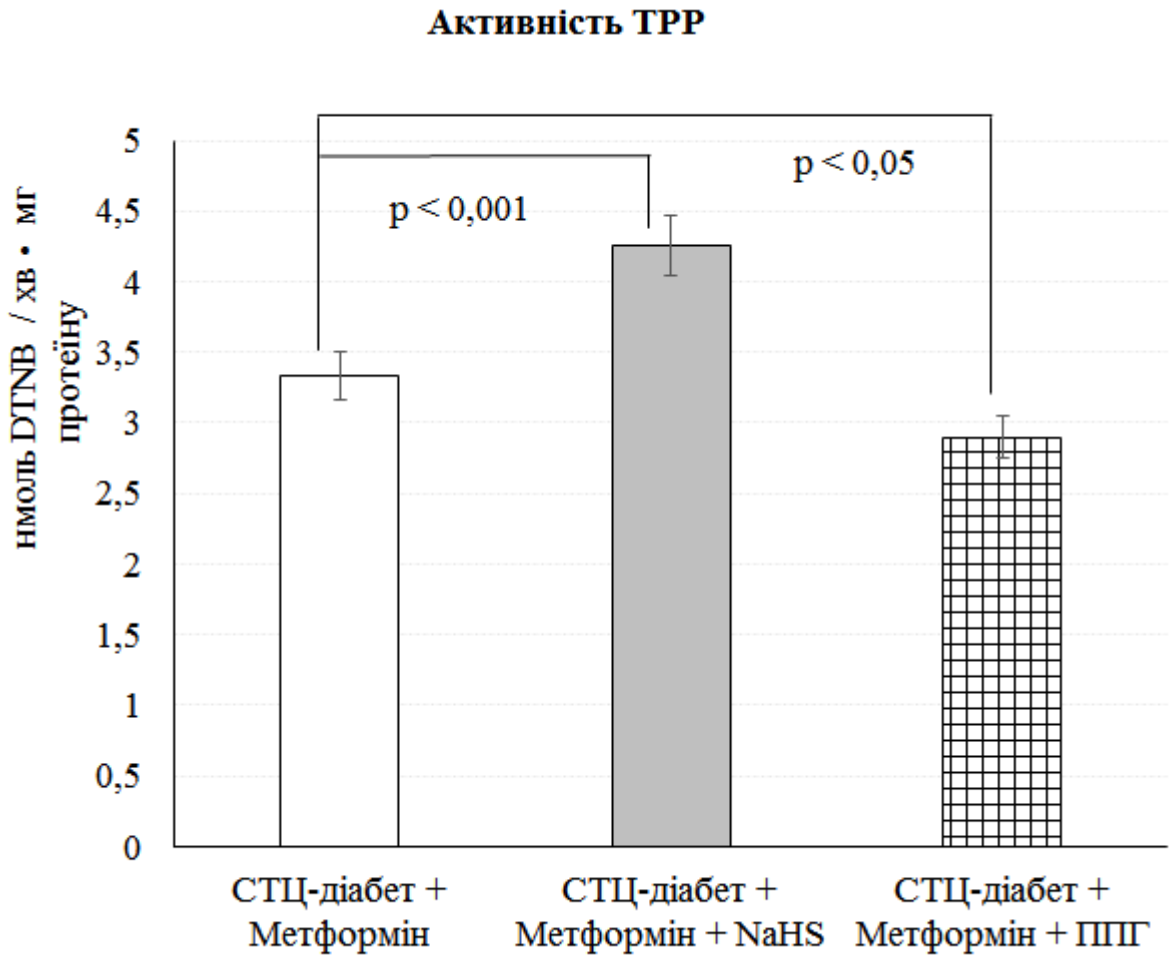


Рис. 3.7 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни активності TRP в нирках щурів з стрептозоточин-їндукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ).

Введення ППГ на тлі ЦД практично повністю нївелювало стимулюючий вплив метформїну на депонування  $H_2S$  за участі TRP в нирках. В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» за середнім показником активність TRP в нирках була статистично достовїрно меншою на 12,9 % нїж у тварин, лікованих лише метформїном (показник медіани становив 2,92 (95 % ДІ 2,23-3,55) нмоль DTNB / хв • мг протеїну) та вірогідно не відрізнялась від показника нелїкованих тварин з СТЦ-діабетом.

### 3.2 Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на H<sub>2</sub>S-індуковану вазодилатацію ниркових артерій за стрептозотоцин-індукованого діабету

Використання гіпоглікемічного засобу метформіну зменшує депримууючий вплив СТЦ-діабету на вазодилатацію ниркових артерій під впливом H<sub>2</sub>S (рис. 3.8, табл. 3.8). З'ясувалось, що у щурів контрольної групи за низьких концентрацій H<sub>2</sub>S (1-10 мкмоль/л) у перфузійному розчині реєструвалось незначне розслаблення ниркових артерій на 12,7-15,2 %. Подальше збільшення концентрацій H<sub>2</sub>S в розчині супроводжувалось дозозалежним зростанням вазодилатації ниркових артерій: в діапазоні концентрацій H<sub>2</sub>S 100-10000 мкмоль/л розслаблення ниркових артерій становило 41,0-76,0 %. За цих умов середньоефективна концентрація H<sub>2</sub>S у нирковій артерії коливалась у діапазоні 78,3-97,5 мкмоль/л (P<sub>5</sub>-P<sub>95</sub>), а показник медіани становив 90,6 мкмоль/л.

Експериментальний ЦД супроводжувався вірогідним зменшенням H<sub>2</sub>S-індукованої вазодилатації ниркових артерій. У групі тварин «СТЦ-діабет» відмічалось зміщення кривої «доза-ефект» праворуч відносно такої у групі контролю. За концентрацій H<sub>2</sub>S в перфузійному розчині 100-10000 мкмоль/л розслаблення ниркових артерій було вірогідно меншим на 10,0-14,9 % порівняно з контрольною групою. Показник середньоефективної концентрації H<sub>2</sub>S у нирковій артерії за середньою величиною був достовірно більшим у 2,27 рази ніж у контролі: показник медіани становив 201 мкмоль/л, а інтерквартильний розмах (P<sub>5</sub>-P<sub>95</sub>) перебував у межах 185-220 мкмоль/л.

Фармакотерапія метформіном викликала статистично достовірне зменшення депримууючого впливу ЦД на стимульовану H<sub>2</sub>S дилатацію ниркових артерій. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін» реєструвалось зміщення кривої «доза-ефект» ліворуч відносно такої у нелікованих тварин з ЦД. За цих умов H<sub>2</sub>S у діапазоні концентрацій 100-10000 мкмоль/л викликав вірогідно більше розслаблення ниркових артерій на 4,0-7,0 % порівняно з

групою тварин, які не отримували лікування. Показник середньоєфективної концентрації  $H_2S$  у нирковій артерії за середньою величиною був статистично вірогідно меншим на 22,8 % ніж у нелікованих тварин: показник медіани становив 158 мкмоль/л, а інтерквартильний розмах ( $P_5$ - $P_{95}$ ) перебував у межах 141-169 мкмоль/л. Кореляційний аналіз виявив наявність сильного оберненого зв'язку між рівнем глікемії та показником середньоєфективної концентрації  $H_2S$  в ниркових артеріях, що є непрямим доказом асоціації між гіпоглікемічною дією метформіну та його впливом на  $H_2S$ -індуковану вазодилатацію ниркових артерій.

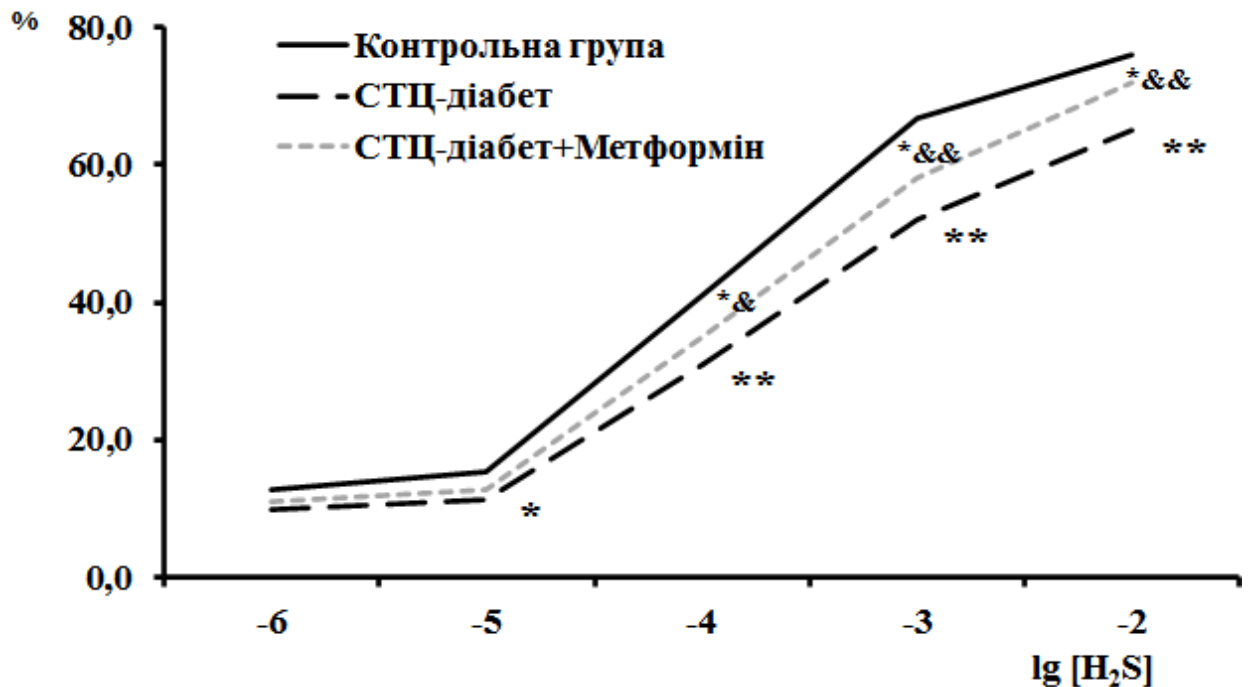


Рис. 3.8 Вплив метформіну на  $H_2S$ -стимульоване розслаблення ниркових артерій у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=4$ ). Примітки: 1. по осі абсцис – десятковий логарифм концентрації  $H_2S$  (моль / л) у перфузійному розчині; 2. по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення (у %) передскорочених фенілефрином ниркових артерій під впливом зростаючих концентрацій  $H_2S$ ; 3 - \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ ); 4. & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (& -  $p < 0,05$ , && -  $p < 0,01$ ).

Вплив метформіну на середньоефективну концентрацію  $H_2S$  в нирковій артерії щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету ( $M \pm m$ ;  $n=4$ )

Групи тварин	$EC_{50} (H_2S)$ , мкмоль / л	Кореляція з рівнем глюкози в сироватці крові
Контрольна група	$89,1 \pm 5,77$	$r_s = -0,73$ ( $p < 0,01$ )
СТЦ-діабет	$202 \pm 9,88^{***}$	
СТЦ-діабет + Метформін	$156 \pm 8,12^{**\&\&}$	

Примітки:

- \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ );
- & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (&& -  $p < 0,01$ );
- статистична достовірність коефіцієнту кореляції Спірмана, розрахована для  $n=12$  ( $p < 0,01$  при  $|r_s| \geq 0,71$ ).

Застосовані модулятори обміну  $H_2S$  модифікували вплив метформіну на  $H_2S$ -індуковану вазодилатацію ниркових артерій за експериментального ЦД (рис. 3.9-3.10).

Донор гідроген сульфїду потенціював стимулюючий вплив метформіну на вазодилатацію ниркової артерій під впливом  $H_2S$  за СТЦ-діабету. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін +  $NaHS$ » відмічалось зміщення кривої «доза-ефект» ліворуч відносно монотерапії метформіном. За концентрацій  $H_2S$  в перфузійному розчині 100-10000 мкмоль/л розслаблення ниркових артерій було вірогідно більшим на 4,0-6,0 % порівняно з тваринами, які отримували монотерапію метформіном. Середньоефективна концентрації  $H_2S$  у нирковій артерії була достовірно меншою на 29,5 % ніж у лікованих лише метформіном: показник медіани становив 109 мкмоль/л, а інтерквартильний розмах ( $P_5$ - $P_{95}$ ) перебував у межах 100-122 мкмоль/л.

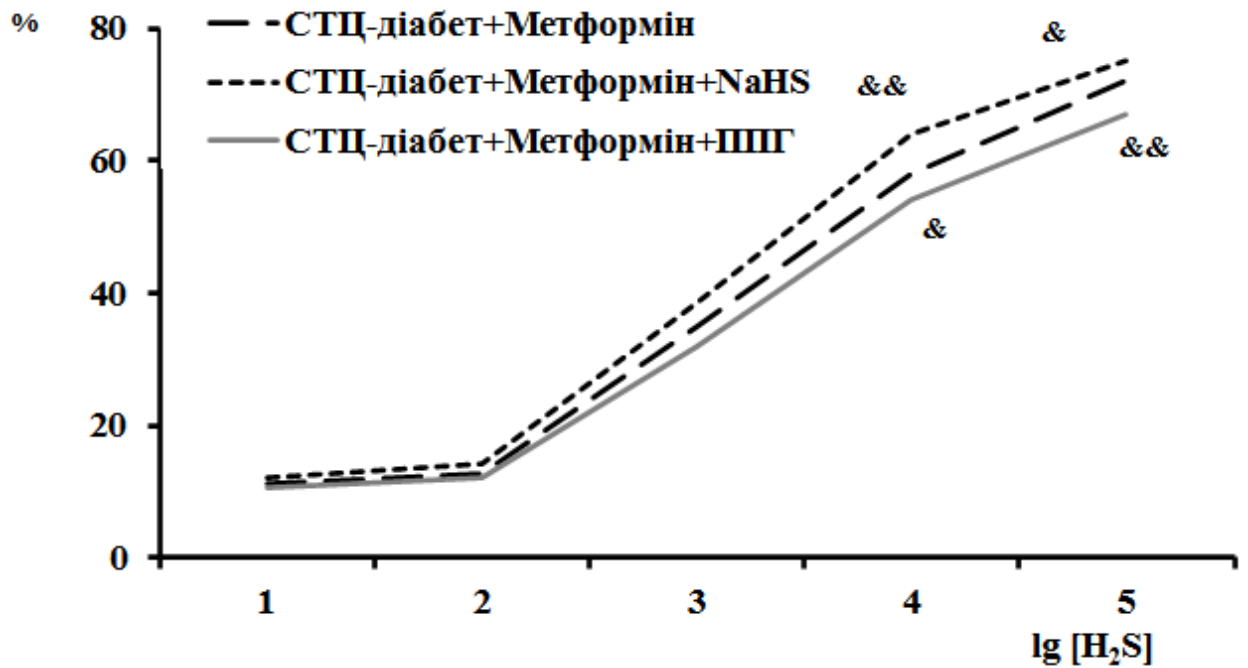


Рис. 3.9 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни H<sub>2</sub>S-стимульованого розслаблення ниркових артерій у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=4$ ). Примітки: 1. по осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H<sub>2</sub>S (моль / л) у перфузійному розчині; 2. по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення (у %) передскорочених фенїлефріном ниркових артерій під впливом зростаючих концентрацій H<sub>2</sub>S; 3. & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом, лікованих лише метформїном (& -  $p < 0,05$ , && -  $p < 0,01$ ).

Використання інгібітору пропаргілгліцину зменшувало активуючий вплив метформіну на вазодилатацію ниркової артерій під впливом H<sub>2</sub>S за СТЦ-діабету. Виявилось, що у групі «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» реєструвалось зміщення кривої «доза-ефект» праворуч відносно монотерапії метформїном. В діапазоні концентрацій H<sub>2</sub>S 100-10000 мкмоль/л розслаблення ниркових артерій було достовірно меншим на 3,0-5,0 % порівняно з тваринами, які отримували монотерапію метформїном. За цих умов середня величина середньоефективної концентрації H<sub>2</sub>S у нирковій артерії була

достовірно більшою на 18,6 % ніж у тварин, лікованих лише метформіном: показник медіани становив 181 мкмоль/л, а інтерквартильний розмах ( $P_5$ - $P_{95}$ ) перебував у межах 173-202 мкмоль/л.

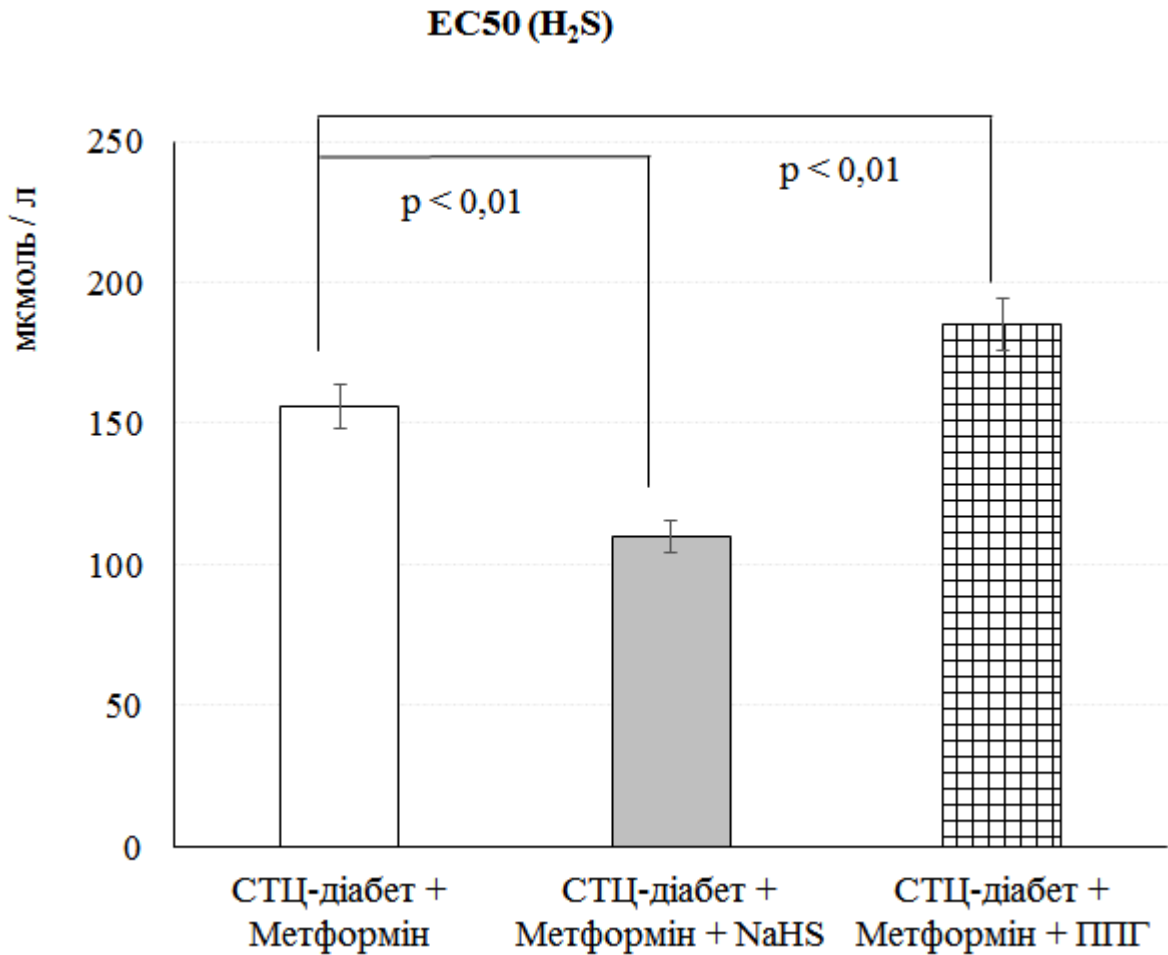


Рис. 3.10 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформіном зміни середньоефективної концентрації H<sub>2</sub>S в нирковій артерії щурів з стрептозоточин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=4$ ).

### Резюме до розділу 3.

Проведені дослідження засвідчили, що одноразове введення стрептозоточину спричиняє розвиток гіперглікемії, що супроводжується формуванням дефіциту H<sub>2</sub>S, зменшенням H<sub>2</sub>S-продукуючої активності ЦГЛ, ЦБА, ЦАТ / 3-МСТ, зростанням швидкості утилізації H<sub>2</sub>S, зниження здатності

H<sub>2</sub>S депонуватись у формі персульфідів за участі TRP та зменшенням H<sub>2</sub>S-індукованої вазодилатації ниркових артерій.

Використання метформіну виявляє потужну гіпоглікемічну активність та зменшує пертурбації метаболізму H<sub>2</sub>S в нирках: вірогідно зростає рівень H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>S-продукуюча активність ЦГЛ, ЦБА, ЦАТ / 3-МСТ, зменшується швидкість утилізації H<sub>2</sub>S та підвищується активність TRP. Поряд з цим збільшується чутливість ниркових артерій до вазодилатуючої дії H<sub>2</sub>S

Застосування модуляторів обміну H<sub>2</sub>S змінювало гіпоглікемічну активність метформіну та його вплив на обмін H<sub>2</sub>S в нирках за СТЦ-діабету. Введення донору H<sub>2</sub>S – NaHS посилювало гіпоглікемічну дію метформіну, його здатність коригувати обмін H<sub>2</sub>S в нирках та стимулювати H<sub>2</sub>S-ініційовану вазодилатацію ниркових артерій, тоді як використання інгібітору ППГ виявляло протилежний ефект.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [4, 5, 12, 16, 18, 19].



## РОЗДІЛ 4

БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ СТАНУ НИРОК ЩУРІВ НА ТЛІ  
ЗАСТОСУВАННЯ МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЇ З  
МОДУЛЯТОРАМИ ОБМІНУ  $H_2S$  ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО  
ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Одним із основних препаратів, який широко використовуються для лікування ЦД 2 типу є метформін. Поряд з потужною гіпоглікемічною дією метформін коригує фільтраційну функцію нирок, тубулярну дисфункцію, зменшує активність запального процесу, апоптозу, нефросклерозу за діабетичної нефропатії [56, 102].

В попередньому розділі встановлено, що однією із молекулярних мішеней дії метформіну за експериментального ЦД є  $H_2S$ -сигнальна система. Показано, що використання донорів  $H_2S$  та інгібіторів його синтезу модифікує його гіпоглікемічну активність та вплив на систему  $H_2S$  в нирках.

Залишається невивченим роль системи  $H_2S$  у механізмах впливу метформіну на функціональний стан нирок, основні патогенетичні ланки ураження нирок за ЦД. Також невивчена здатність модуляторів обміну  $H_2S$  модифікувати в нирках протизапальну, антиапоптотичну, антифіброгенну та антиоксидантну дію метформіну за ЦД. Вирішення цих питань дозволить знайти шляхи оптимізації фармакотерапії діабетичної нефропатії.

Метою дослідження цього розділу є оцінити вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну  $H_2S$  на функціонування нирок та патохімічні механізми ураження нирок за експериментального ЦД.

Для вирішення поставленої мети нами були окреслені наступні завдання дослідження:

- 1) Оцінити вплив метформіну та його поєднання з  $NaHS$  і ППГ на основні параметри функціонального стану нирок та показники іонорегуляторної функції нирок за СТЦ-діабету.

2) Дослідити вплив метформіну та його поєднання з NaHS і ППГ на основні патохімічні механізми ураження нирок (запалення, апоптоз, нефросклероз та оксидативний стрес) за СТЦ-діабету.

4.1 Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на функціональний стан нирок щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету

Гіпоглікемічний засіб метформін зменшував виразність ретенційної азотемії у щурів за СТЦ-діабету (табл. 4.1).

Виявилось, що в контрольній групі показник медіани вмісту креатиніну в сироватці крові становив 94,8 (95 % ДІ 76,0-104) мкмоль/л, а персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) перебував в межах 84,9-97,0 мкмоль/л.

Експериментальний ЦД викликав розвиток ретенційної азотемії про що доказово свідчило вірогідне зростання середнього показника креатиніну в сироватці крові в 2,6 рази порівняно з контролем. У групі тварин «СТЦ-діабет» показник медіани вмісту креатиніну в сироватці крові становив 236 (95 % ДІ 218-250) мкмоль/л, а персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) перебував в межах 225-243 мкмоль/л.

Застосування метформіну за експериментального ЦД супроводжувалось статистично достовірним зменшенням середнього показника сироваткового рівня креатиніну на 36,2 % відносно нелікованих тварин. За цих умов показник медіани вмісту креатиніну в сироватці крові становив 150 (95 % ДІ 135-171) мкмоль/л, а персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) перебував в межах 139-157 мкмоль/л.

Проведений кореляційний аналіз засвідчив наявність обернених кореляцій середньої сили ( $r = -0,54$ ,  $p < 0,01$ ) між сироватковим рівнем креатиніну та вмістом  $H_2S$  в нирках. Отримані результати є непрямим доказом асоціації між зниженням рівня азотемії та збільшенням вмісту  $H_2S$  в нирках за умов фармакотерапії метформіном експериментального ЦД.

Вміст креатиніну в сироватці крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за введення метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин		Креатинін мкмоль / л	p між групами
1	Контрольна група	91,3±2,45	$p_{1-2} < 0,001$
2	СТЦ-діабет	235±2,99	$p_{1-3} < 0,001$
3	СТЦ-діабет + Метформін	150±3,27	$p_{2-3} < 0,001$

Примітка: нижні індекси біля p вказують на статистичну вірогідність відмінностей показників між відповідними досліджуваними групами.

Використання модуляторів обміну  $H_2S$  мало різнонаправлений вплив на антиазотемічну активність метформіну у щурів за умов експериментального ЦД (рис. 4.1).

З'ясувалось, що введення донору  $H_2S$  посилювало антиазотемічну активність метформіну за СТЦ-діабету. У тварин групи «СТЦ-діабет + Метформін +  $NaHS$ » середній показник вмісту креатиніну в сироватці крові був вірогідно меншим на 30,0 % ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном, а також достовірно перевищував контрольну групу на 15,0 %. За цих умов величина медіани сироваткового рівня креатиніну становила 106 (95 % ДІ 88,2-121) мкмоль / л.

Застосування інгібітору синтезу  $H_2S$  виявляло протилежний ефект щодо  $NaHS$  - реєструвалось зменшення антиазотемічної активності метформіну за СТЦ-діабету. У тварин групи «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» середній показник вмісту креатиніну в сироватці крові був вірогідно більшим на 32,7 % ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном, а також достовірно поступався контрольній групі на 15,3 %. За цих умов величина медіани сироваткового рівня креатиніну становила 203 (95 % ДІ 179-217) мкмоль / л.

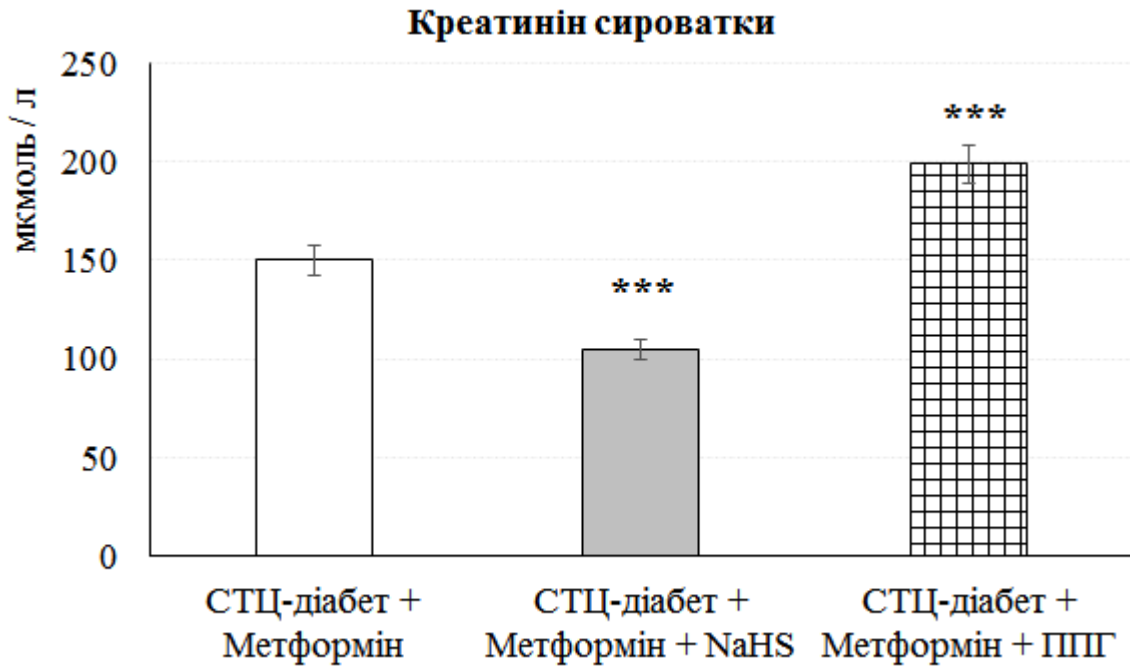


Рис. 4.1 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни вмісту креатинїну в сироватці крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ). Примітка. \*\*\* -  $p < 0,001$  відносно групи «СТЦ-діабет + Метформін».

Введення гіпоглікемічного засобу метформїну зменшує ініційовані експериментальним ЦД зміни показників функціонування нирок - діурезу, кліренсу креатинїну та відносної реабсорбції води у щурів за умов експериментального ЦД (табл. 4.2).

Виявилось, що станом на 28 добу після одноразового введення стрептозотоцину реєструвались поліурія (діурез зростав в 1,72 рази порівняно з контролем), зменшення фільтраційної здатності нирок (кліренс креатинїну зменшувався на 23,1 % відносно контролю) та реабсорбції води (показник відносної реабсорбції знижувався на 3,17 %).

Введення метформїну за СТЦ-діабету супроводжувалось вірогідно меншим порушенням функціонування нирок: діурез був вірогідно меншим на 17,8 %, а кліренс креатинїну та відносна реабсорбція води – більшими відповідно на 13,1 та 1,66 % відносно таких показників у нелікованих тварин.

Кореляційний аналіз показав, що між рівнем  $H_2S$  в нирках та показником діурезу виникав помірної сили обернений зв'язок ( $r = -0,42$ ,  $p < 0,01$ ), а з показниками кліренсу креатиніну й відносної реабсорбції води – прямий зв'язок ( $r = 0,54-0,73$ ,  $p < 0,001$ ). Отримані дані засвідчують, що покращення фільтраційної функції нирок, реабсорбції води та зменшення діурезу на тлі введення метформіну за ЦД асоціюється з його здатністю поповнювати запаси  $H_2S$  в нирках.

Таблиця 4.2

Вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфїду на показники діурезу, кліренсу креатиніну та відносної реабсорбції води у щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету

( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	Діурез, мл / 6 год.	Кліренс креатиніну мл / хв	ВР $H_2O$ , %
Контрольна група	5,76±0,14	0,488±0,016	97,5±0,06
СТЦ-діабет	9,88±0,19 ***	0,375±0,016 ***	94,4±0,14 ***
СТЦ-діабет + Метформін	8,12±0,22 ***&&&	0,424±0,012 *&&&	96,0±0,07 ***&&&
СТЦ-діабет + Метформін + NaHS	6,54±0,18 **&&&###	0,485±0,014 &&&###	97,2±0,05 &&&###
СТЦ-діабет + Метформін + ППГ	9,28±0,20 ***&###	0,377±0,013 ***#	94,8±0,10 ***&###

Примітки:

- \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ );
- & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (& -  $p < 0,05$ , &&& -  $p < 0,001$ );
- # - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін» (# -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,01$ , ### -  $p < 0,001$ ).

Застосування модуляторів обміну гідроген сульфїду модифїкувало вплив метформїну на вказанї показники функціонування нирок у щурів за СТЦ-діабету (табл. 4.2). Так, NaHS посилював захисну дію метформїну щодо нирок, тоді як пропаргїлгліцин виявляв протилежний ефект. В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформїн + NaHS» показник діурезу був вірогідно меншим на 19,5 %, а кліренс креатинїну та відносна реабсорбція води – більшими на 14,3 та 1,23 % відносно тварин, лікованих лише метформїном. Натомість у щурів, які отримували метформїн в комбінації з ППГ показник діурезу був вірогідно більшим відповідно на 14,3 %, а кліренс креатинїну та відносна реабсорбція води – меншими на 11,1 та 1,21 % порівняно з тваринами, лікованими лише метформїном.

Фармакотерапія метформїном супроводжувалась зменшенням виразності протеїнурії, індукованої одноразовим введенням діабетогенної речовини стрептозотоцину (табл. 4.3).

В контрольній групі показник медіани екскреції білку з сечею становив 0,909 (95 % ДІ 0,859-0,968) мг / 6 год, а персентильний розмах (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>) перебував в межах 0,883-0,931 мг / 6 год.

За умов експериментального ЦД ініційованого стрептозотоцином реєструвався розвиток протеїнурії про що доказово свідчило вірогідне зростання середнього показника екскреції білку з сечею в 2,4 рази порівняно з контролем. У групі тварин «СТЦ-діабет» показник медіани екскреції білку з сечею становив 2,12 (95 % ДІ 1,58-2,72) мг / 6 год, а персентильний розмах (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>) перебував в межах 1,86-2,38 мг / 6 год.

Використання метформїну за експериментального ЦД супроводжувалось статистично вірогідним зниженням середнього показника екскреції білку з сечею на 25,1 % відносно нелікованих тварин. За цих умов показник медіани екскреції білку з сечею становив 1,58 (95 % ДІ 0,98-2,22) мг / 6 год, а персентильний розмах (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>) перебував в межах 1,39-1,86 мг / 6 год. Проведений кореляційний аналіз засвідчив наявність оберненого зв'язку середньої сили ( $r = -0,68, p < 0,01$ ) між екскрецією білку з сечею та вмістом H<sub>2</sub>S

в нирках. Отже, зменшення рівня протеїнурії на тлі терапії ЦД метформіном супряжено зі збільшенням вмісту  $H_2S$  в нирках.

Таблиця 4.3

Екскреція білку з сечею у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за введення метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин		Білок мг / 6 год.	p між групами
1	Контрольна група	0,912±0,010	p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001 p <sub>2-3</sub> < 0,001
2	СТЦ-діабет	2,15±0,10	
3	СТЦ-діабет + Метформін	1,61±0,11	

Примітка: нижні індекси біля p вказують на статистичну вірогідність відмінностей показників між відповідними досліджуваними групами.

Застосування модуляторів обміну  $H_2S$  мало різновекторний вплив на здатність метформіну зменшувати ступінь протеїнурії у щурів за умов експериментального ЦД (рис. 4.2).

Введення донору  $H_2S$  потенціувало здатність метформіну зменшувати екскрецію білка з сечею за СТЦ-діабету. У тварин групи «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» середній показник протеїнурії був вірогідно меншим на 21,2 % ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном, а також достовірно перевищував контрольну групу на 39,2 %. За цих умов величина медіани екскреції білку з сечею становила 1,22 (95 % ДІ 0,81-1,84) мг / 6 год.

Інгібітору синтезу  $H_2S$  навпаки обмежував коригуючу дію метформіну щодо зменшення ступеня протеїнурії за СТЦ-діабету. У тварин групи «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» середній показник протеїнурії був вірогідно більшим на 18,0 % ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном, а також достовірно поступався контрольній групі на 11,6 %. За цих умов

величина медіани екскреції білку з сечею становила 1,98 (95 % ДІ 1,44-2,27) мг / 6 год.

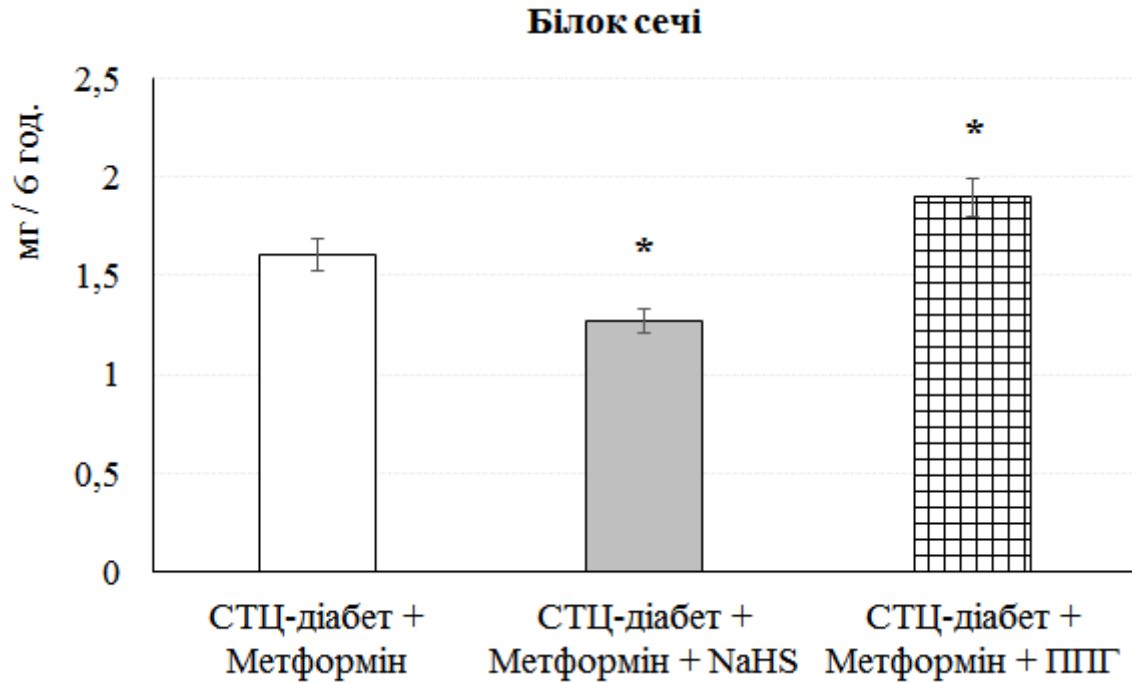


Рис. 4.2 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни екскреції білку з сечею у щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ). Примітка. \* -  $p < 0,05$  відносно групи «СТЦ-діабет + Метформін».

Фармакотерапія метформїном зменшує ініційовані ЦД порушення іонорегуляторної функції нирок за СТЦ-діабету (табл. 4.4).

Виявилось, що СТЦ-діабет викликає зменшення натрійурезу на 39,1 %, зростанням екскреції калію з сечею на 20,3 % та зменшення співвідношення  $Na^+ / K^+$  сечі на 49,4 % порівняно з контролем.

Застосування метформїну в значній мірі попереджує ініційовані стрептозотоцином порушення іонорегуляторної функції нирок. За цих умов відмічається зниження екскреції калію з сечею відповідно на 7,51 % ( $p < 0,001$ ), а також збільшення натрійурезу й співвідношення  $Na^+ / K^+$  сечі відповідно на 18,6 та 28,4 % порівняно з нелікованими тваринами. За



результатами кореляційного аналізу між рівнем  $\text{H}_2\text{S}$  в нирках та показниками натрійурезу, співвідношення  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  сечі виникав помірної сили прямий зв'язок ( $r = 0,58-0,62$ ,  $p < 0,001$ ), а показником екскреції калію з сечею – помірної сили обернений зв'язок ( $r = -0,37$ ,  $p < 0,01$ ). Отримані дані є свідченням залученості системи  $\text{H}_2\text{S}$  в механізми коригуючого впливу метформіну на електролітний обмін за СТЦ-діабету.

Таблиця 4.4

Вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфїду на іонорегуляторну функцію нирок у щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету

( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	$\text{Na}^+$ сечі, мкмоль / 6 год.	$\text{K}^+$ сечі, мкмоль / 6 год.	$\text{Na}^+ / \text{K}^+$ сечі
Контрольна група	$2,30 \pm 0,11$	$35,4 \pm 0,58$	$0,065 \pm 0,002$
СТЦ-діабет	$1,40 \pm 0,07$ ***	$42,6 \pm 0,60$ ***	$0,033 \pm 0,001$ ***
СТЦ-діабет + Метформін	$1,66 \pm 0,09$ ***&&&	$39,4 \pm 0,50$ ***&&&	$0,042 \pm 0,002$ ***&&&
СТЦ-діабет + Метформін + $\text{NaHS}$	$1,93 \pm 0,08$ ***&&&#	$35,2 \pm 0,44$ &&&####	$0,055 \pm 0,002$ **&&&####
СТЦ-діабет + Метформін + ППГ	$1,38 \pm 0,05$ ***###	$43,5 \pm 0,55$ ***####	$0,032 \pm 0,001$ ***####

Примітки:

- \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ );
- & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (& -  $p < 0,05$ , &&& -  $p < 0,001$ );
- # - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін» (# -  $p < 0,05$ , ### -  $p < 0,01$ , #### -  $p < 0,001$ ).

Модулювання обміну  $H_2S$  чинить різноспрямований вплив на іонорегуляторну функцію нирок (табл. 4.4). У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін +  $NaHS$ » екскреція калію з сечею вірогідно менша на 10,7 %, а натрійурез та співвідношення  $Na^+ / K^+$  сечі більші відповідно на 16,3 та 30,1 %, відносно тварин, які отримували лише метформін. За умов введення ППГ вказані показники наближались до таких у тварин з СТЦ-діабетом без лікування: екскреція калію з сечею вірогідно більша на 10,4 %, а натрійурез та співвідношення  $Na^+ / K^+$  сечі менші відповідно на 16,9 та 24,6 % ( $p < 0,01$ ) ніж у тварин, лікованих метформін.

Фармакотерапія метформіном супроводжувалась коригуючим впливом на секрецію альдостерону за експериментального ЦД (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Вміст альдостерону в сироватці крові щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за введення метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин		Альдостерон пг / мл	p між групами
1	Контрольна група	210±3,99	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$
2	СТЦ-діабет	430±5,37	
3	СТЦ-діабет + Метформін	352±6,66	

Примітка: нижні індекси біля p вказують на статистичну вірогідність відмінностей показників між відповідними досліджуваними групами.

В контрольній групі показник медіани сироваткового рівня альдостерону становив 214 (95 % ДІ 190-233) пг/мл, а персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) перебував в межах 195-220 пг/мл.

Експериментальний ЦД супроводжувався порушенням секреції альдостерону про що доказово свідчило вірогідне збільшення сироваткового

рівня гормону в 2,1 рази порівняно з відповідним показником контролю. У групі тварин «СТЦ-діабет» показник медіани рівня альдостерону в сироватці крові становив 428 (95 % ДІ 399-462) пг/мл, а персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) знаходився у діапазоні 416-446 пг/мл.

Застосування метформіну за експериментального ЦД супроводжувалось статистично вірогідним зниженням середнього показника сироваткового рівня альдостерону на 18,1 % відносно нелікованих тварин. За цих умов показник медіани становив 351 (95 % ДІ 321-388) пг/мл, а персентильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) перебував в межах 328-372 пг/мл. За результатами кореляційного аналізу між рівнем  $H_2S$  в нирках та сироватковим вмістом альдостерону виникав обернений зв'язок середньої сили ( $r = -0,66$ ,  $p < 0,01$ ). Отримані дані свідчать, що система  $H_2S$  є однією із молекулярних мішеней через яку реалізується вплив метформіну на секрецію альдостерону за СТЦ-діабету.

Використання модуляторів обміну  $H_2S$  мало різновекторний вплив на здатність метформіну зменшувати секрецію альдостерону у щурів за умов експериментального ЦД (рис. 4.3).

Донор  $H_2S$  посилював здатність метформіну зменшувати секрецію альдостерону за СТЦ-діабету. У тварин групи «СТЦ-діабет + Метформін +  $NaHS$ » середній показник сироваткового рівня альдостерону був вірогідно меншим на 24,2 % ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном, а також достовірно перевищував контрольну групу на 27,1 %. За цих умов величина медіани вмісту альдостерону в сироватці крові становила 266 (95 % ДІ 234-299) нг/мл.

Застосування ППГ навпаки обмежувало депримуєчу дію метформіну на секрецію альдостерону за СТЦ-діабету. У тварин групи «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» середній показник сироваткового рівня альдостерону був вірогідно більшим на 13,6 % ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном, а також достовірно перевищував контрольну групу на 7,0 %. За

цих умов величина медіани вмісту альдостерону в сироватці крові становила 396 (95 % ДІ 365-436) нг/мл.

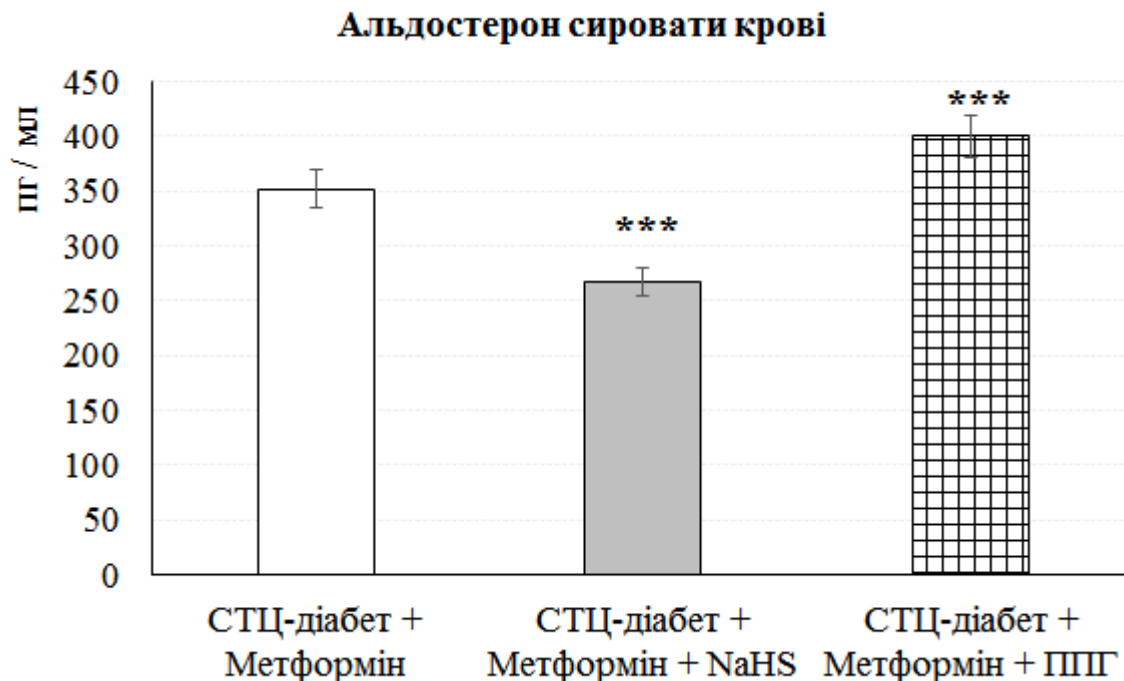


Рис. 4.3 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни вмісту альдостерону в сироватці крові щурів з стрептозотоцин-їндукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ). Примїтка. \*\*\* -  $p < 0,001$  відносно групи «СТЦ-діабет + Метформін».

4.2 Вплив метформїну та його комбїнації з NaHS і пропаргїлгліцином на активність процесів запалення, апоптозу, нефросклерозу та оксидативного стресу в нирках щурів за стрептозотоцин-їндукованого діабету

Застосування метформїну виявляє антисклеротичну дію в нирках за експериментального ЦД про що свїдчать зміни рївня галектину-3 в нирках щурів (табл. 4.6).

В контрольній групї тварин рївень галектину-3 в нирках змінювався від 47,6 нг/мг протеїну ( $P_5$ ) до 69,5 нг/мг протеїну ( $P_{95}$ ), інтерквартильний розмах

(P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>) знаходився у діапазоні 53,8-64,1 пг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 59,0 пг/мг протеїну.

Розвиток ЦД супроводжувався індукцією фіброгенезу в нирках про що доказово свідчило вірогідне зростання середнього показника вмісту галектину-3 в нирках у 5,3 рази порівняно з контролем. У групі «СТЦ-діабет» рівень галектину-3 в нирках змінювався від 270 пг/мг протеїну (P<sub>5</sub>) до 361 пг/мг протеїну (P<sub>95</sub>), інтерквартильний розмах (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>) знаходився у діапазоні 290-332 пг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 307 пг/мг протеїну.

Використання метформіну зменшувало ознаки нефросклерозу, ініційовані ЦД, доказом чого було вірогідне зниження середнього показника вмісту галектину-3 в нирках на 48,4 % порівняно з нелікованими тваринами. У групі «СТЦ-діабет + Метформін» рівень галектину-3 в нирках змінювався від 145 пг/мг протеїну (P<sub>5</sub>) до 177 пг/мг протеїну (P<sub>95</sub>), інтерквартильний розмах (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>) знаходився у діапазоні 150-170 пг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 162 пг/мг протеїну. За результатами кореляційного аналізу збільшення рівня H<sub>2</sub>S в нирках на тлі терапії ЦД метформіном асоціювалось зі зменшенням виразності нефросклерозу (r=-0,59, p<0,01).

Таблиця 4.6

Вміст галектину-3 в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за введення метформіну (M±m, n=15)

Групи тварин		Галектин-3 пг / мг протеїну	p між групами
1	Контрольна група	58,9±1,98	p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001 p <sub>2-3</sub> < 0,001
2	СТЦ-діабет	312±8,18	
3	СТЦ-діабет + Метформін	161±3,07	

Примітка: нижні індекси біля p вказують на статистичну вірогідність відмінностей показників між відповідними досліджуваними групами.

Введення модуляторів обміну  $H_2S$  змінювало антифіброгенну дію метформіну в нирках за ЦД (рис. 4.4).

Донор  $H_2S$  потенціював антифіброгенну активність метформіну за експериментального ЦД. У групі «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» середній показник ниркового вмісту галектину-3 був вірогідно меншим на 36,6 % ніж за монотерапії метформіном, а також перевищував на 73,2 % показник контролю.

Застосування ППГ навпаки зменшувало депримуєчу дію метформіну на процеси фіброгенезу за ЦД. У групі «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» середній показник вмісту галектину-3 у нирках був вірогідно більшим на 41,6 % ніж за монотерапії метформіном, а також меншим на 26,9 % порівняно з нелікованими тваринами.

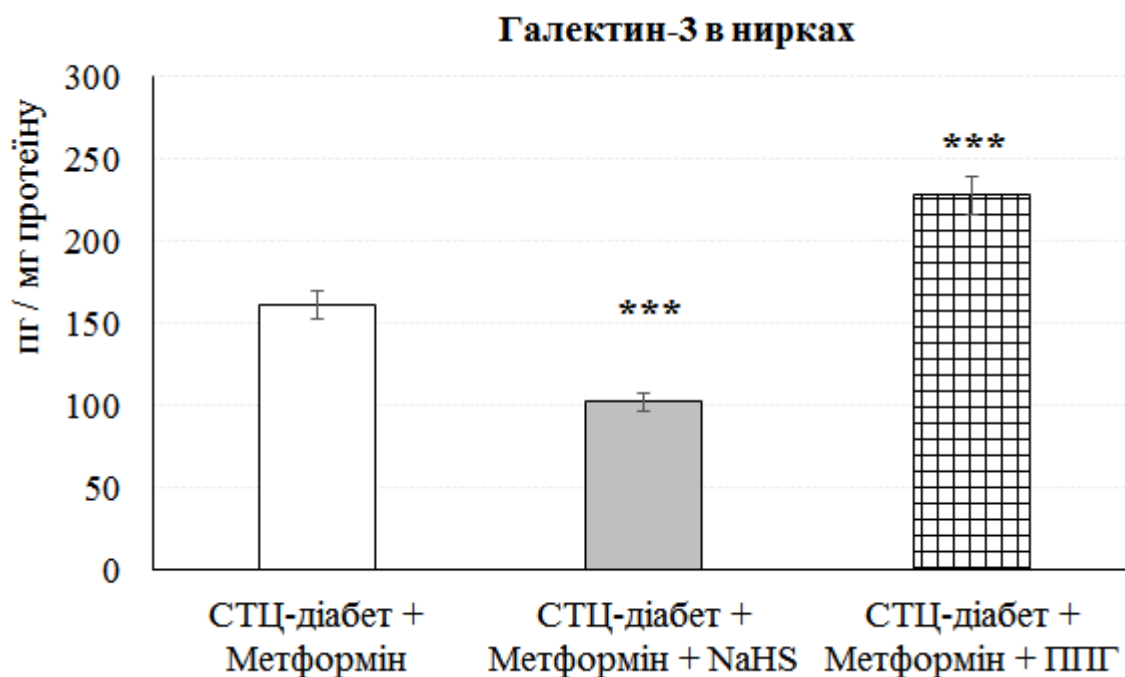


Рис. 4.4 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни вмісту галектину-3 в нирках щурів з стрептозотоцин-їндукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ). Примїтка. \*\*\* -  $p < 0,001$  відносно групи «СТЦ-діабет + Метформін».

Фармакотерапія метформіном характеризувалась антиапоптотичною дією в нирках за експериментального ЦД доказом чого є зміни рівня каспази-3 в нирках щурів дослідних груп (табл. 4.7).

У групі контролю рівень каспази-3 в нирках змінювався від 0,192 нг/мг протеїну ( $P_5$ ) до 0,426 нг/мг протеїну ( $P_{95}$ ), інтерквартильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) знаходився у діапазоні 0,254-0,380 нг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 0,334 нг/мг протеїну.

Розвиток ЦД супроводжувався активацією апоптозу в нирках про що доказово свідчило статистично достовірне зростання середнього показника вмісту каспази-3 в нирках у 5,6 рази порівняно з контролем. У групі «СТЦ-діабет» рівень каспази-3 в нирках змінювався від 1,30 нг/мг протеїну ( $P_5$ ) до 2,25 нг/мг протеїну ( $P_{95}$ ), інтерквартильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) знаходився у діапазоні 1,56-2,02 нг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 1,89 нг/мг протеїну.

Таблиця 4.7

Вміст каспази-3 в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за введення метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин		Каспаза-3 нг / мг протеїну	p між групами
1	Контрольна група	0,320±0,021	$p_{1-2} < 0,001$
2	СТЦ-діабет	1,80±0,09	$p_{1-3} < 0,001$
3	СТЦ-діабет + Метформін	1,15±0,05	$p_{2-3} < 0,001$ $r=-0,69$

Примітка: нижні індекси біля p вказують на статистичну вірогідність відмінностей показників між відповідними досліджуваними групами.

Введення метформіну мало депримуєчий вплив на активність апоптозу в нирках за СТЦ-діабету доказом чого було вірогідне зниження середнього показника рівня каспази-3 в нирках на 36,1 % порівняно з

нелікованими тваринами. У групі «СТЦ-діабет + Метформін» рівень каспази-3 в нирках змінювався від 0,93 нг/мг протеїну ( $P_5$ ) до 1,44 нг/мг протеїну ( $P_{95}$ ), інтерквартильний розмах ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) знаходився у діапазоні 0,99-1,27 нг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 1,13 нг/мг протеїну. Кореляційний аналіз показав, що збільшення запасів  $H_2S$  в нирках на тлі терапії ЦД метформіном супречено зі зменшенням активності апоптозу в нирках щурів ( $r=-0,69$ ,  $p<0,01$ ).

Модулювання обміну  $H_2S$  за експериментального ЦД виявляло різноспрямований вплив на ініційовані метформіном зміни активності апоптозу в нирках (рис. 4.5).

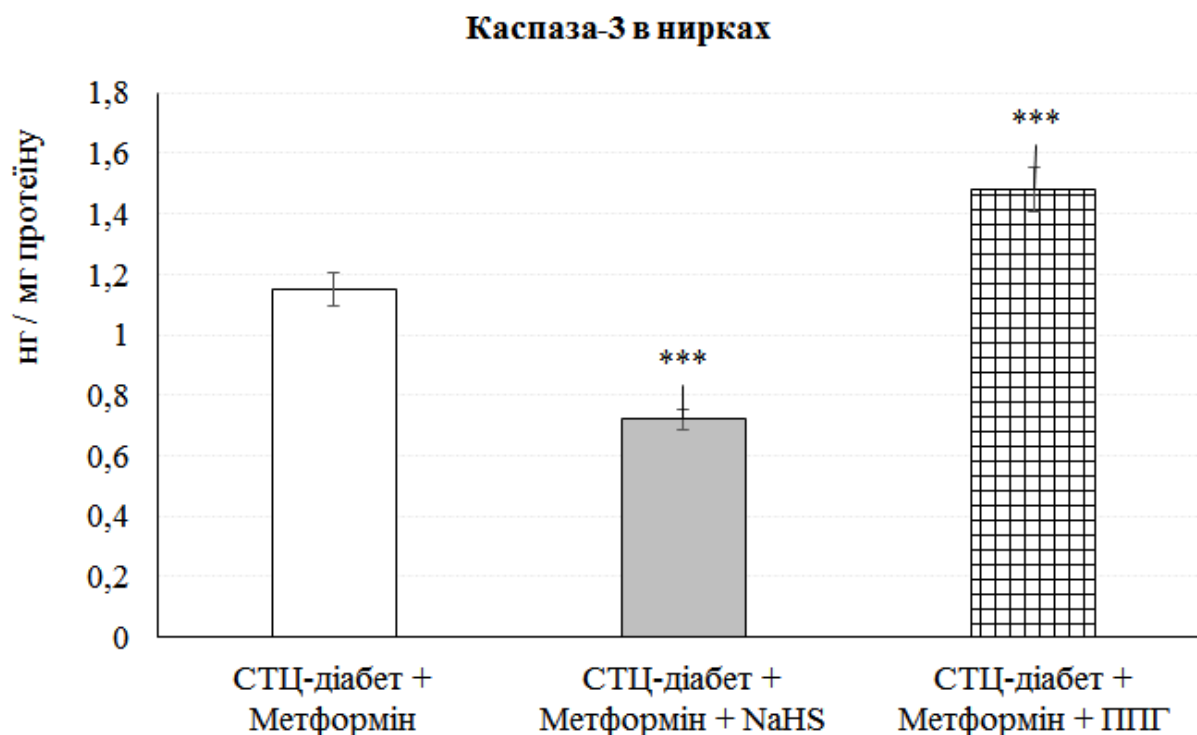


Рис. 4.5 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформіном зміни вмісту каспази-3 в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом ( $M\pm m$ ;  $n=15$ ). Примітка. \*\*\* -  $p < 0,001$  відносно групи «СТЦ-діабет + Метформін».



Використання NaHS посилювало антиапоптотичну активність метформіну за СТЦ-діабету. У групі «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» середній показник вмісту каспази-3 в нирках був вірогідно меншим на 37,0 % ніж за монотерапії метформіном, а також перевищував на 126 % показник контролю.

Інгібування синтезу  $H_2S$  під впливом ППГ обмежувало вплив метформіну на процеси апоптозу за ЦД. У групі «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» середній показник вмісту каспази-3 у нирках був вірогідно більшим на 28,7 % ніж за монотерапії метформіном, а також меншим на 17,8 % порівняно з нелікованими тваринами.

Медикаментозна терапія ЦД метформіном супроводжувалась протизапальною активністю в нирках про що свідчать статистично значимі зміни рівня IL-1 $\beta$  в нирках щурів дослідних груп (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Вміст IL-1 $\beta$  в нирках щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом та за введення метформіну ( $M \pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин		IL-1 $\beta$ пг / мг протеїну	p між групами
1	Контрольна група	45,7 $\pm$ 1,33	$p_{1-2} < 0,001$
2	СТЦ-діабет	95,3 $\pm$ 1,88	$p_{1-3} < 0,001$
3	СТЦ-діабет + Метформін	71,2 $\pm$ 1,81	$p_{2-3} < 0,001$

Примітка: нижні індекси біля p вказують на статистичну вірогідність відмінностей показників між відповідними досліджуваними групами.

У групі контролю рівень IL-1 $\beta$  в нирках змінювався від 38,0 нг/мг протеїну ( $P_5$ ) до 53,1 пг/мг протеїну ( $P_{95}$ ), інтерквартильний розмах ( $P_{25}-P_{75}$ ) знаходився у діапазоні 42,6-50,2 пг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 44,1 пг/мг протеїну.

Введення стрептозотоцину викликало індукцію запальної реакції в нирках про що доказово свідчило статистично значиме зростання середнього показника вмісту IL-1 $\beta$  в нирках у 2,1 рази порівняно з контролем. У групі «СТЦ-діабет» рівень каспази-3 в нирках змінювався від 84,3 пг/мг протеїну (P<sub>5</sub>) до 105 пг/мг протеїну (P<sub>95</sub>), інтерквартильний розмах (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>) знаходився у діапазоні 90,8-102 пг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 97,6 пг/мг протеїну.

Введення метформіну виявляло потужну протизапальну активність в нирках за СТЦ-діабету доказом чого було вірогідне зниження середнього показника рівня IL-1 $\beta$  в нирках на 25,3 % порівняно з нелікованими тваринами. У групі «СТЦ-діабет + Метформін» рівень IL-1 $\beta$  в нирках змінювався від 61,5 пг/мг протеїну (P<sub>5</sub>) до 81,5 пг/мг протеїну (P<sub>95</sub>), інтерквартильний розмах (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>) знаходився у діапазоні 65,3-76,4 пг/мг протеїну, а показник медіани дорівнював 70,3 пг/мг протеїну. Кореляційний аналіз надав докази того, що зменшення дефіциту H<sub>2</sub>S в нирках на тлі терапії ЦД метформіном асоціювалось зі зменшенням активності запальної реакції в нирках щурів (r=-0,52, p<0,01).

Застосовані модулятори обміну H<sub>2</sub>S за експериментального ЦД виявляли різновекторний вплив на протизапальну активність в нирках метформіну (рис. 4.6).

Введення NaHS потенціювало протизапальну активність метформіну за СТЦ-діабету. У групі «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» середній показник вмісту IL-1 $\beta$  в нирках був вірогідно меншим на 18,0 % ніж за монотерапії метформіном, а також перевищував на 27,8 % показник контролю.

Використання інгібітору синтезу H<sub>2</sub>S зменшувало виразність протизапальної дії в нирках метформіну за ЦД. У групі «СТЦ-діабет + Метформін + ППГ» середній показник вмісту IL-1 $\beta$  у нирках був вірогідно більшим на 18,4 % ніж за монотерапії метформіном, а також меншим на 11,5 % порівняно з нелікованими тваринами.

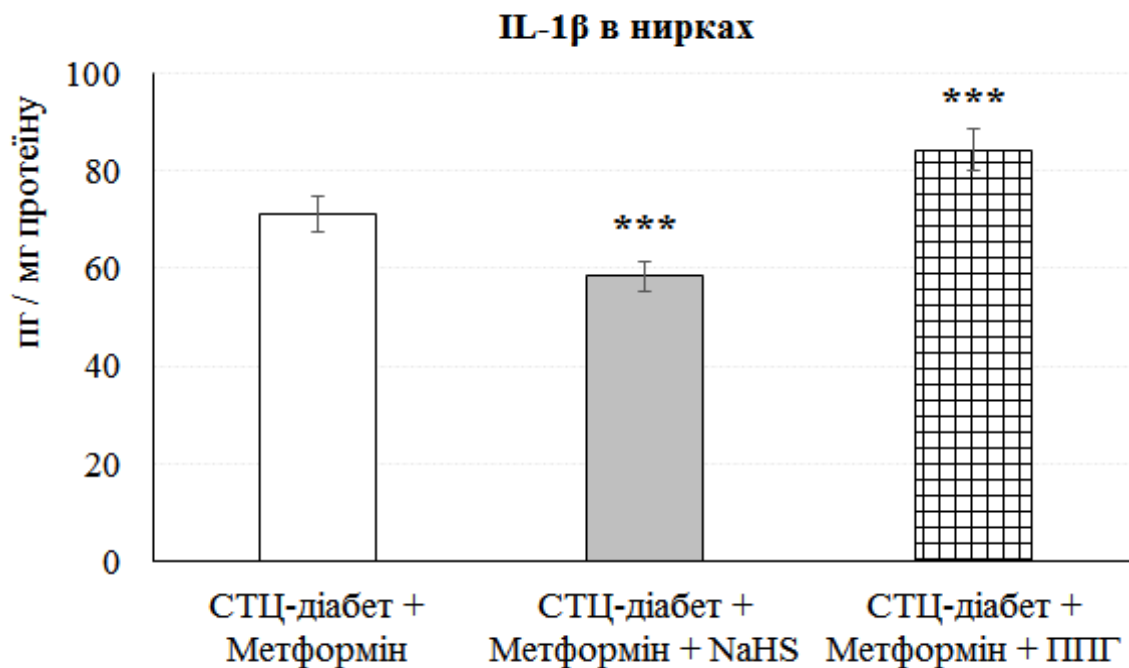


Рис. 4.6 Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на індуковані метформїном зміни вмісту IL-1 $\beta$  в нирках щурів з стрептозотоцин-їндукованим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=15$ ). Примітка. \*\*\* -  $p < 0,001$  відносно групи «СТЦ-діабет + Метформін».

Фармакотерапія метформїном супроводжувалась зменшенням активності вільнорадикального окиснення ліпїдів та окисної модифїкації білків в нирках за СТЦ-діабету (табл. 4.9).

Встановлено, що СТЦ-діабет супроводжувався індукцією в нирках ліпопероксидації та окисної деструкції протеїнів. У групі тварин «СТЦ-діабет» вміст біохїмічних маркерів ліпопероксидації МДА, окисної модифїкації протеїнів КГП були статистично достовїрно більшими відповідно в 1,7 та 2,0 рази, порівняно з контролем.

Застосування метформїну за СТЦ-діабету сповільнювало перебіг вільнорадикального окиснення ліпїдів та протеїнів. В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін» вміст МДА та КГП в нирках були достовїрно меншими відповідно на 27,4 та 24,7 % відносно нелїкованих тварин. За результатами кореляційного аналізу виявлено, що поповнення запасів H<sub>2</sub>S в нирках на тлі

застосування метформіну супряжено зі зменшенням активності вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів в нирках за ЦД ( $r=-(0,52-0,72)$ ,  $p<0,01$ ).

Таблиця 4.9

Вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфїду на вміст продуктів ліпопероксидації та окисної модифікації білків в нирках щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету  
( $M\pm m$ ,  $n=15$ )

Групи тварин	МДА, мкмоль / мг протеїну	КГП, нмоль / мг протеїну
Контрольна група	3,22±0,18	0,865±0,037
СТЦ-діабет	5,44±0,14 ***	1,74±0,02 ***
СТЦ-діабет + Метформін	3,95±0,17 **&&&	1,31±0,03 ***&&&
СТЦ-діабет + Метформін + NaHS	3,20±0,14 &&#	0,871±0,039 &&####
СТЦ-діабет + Метформін + ППГ	4,76±0,15 ***&&####	1,55±0,04 ***&&####

Примітки:

- \* - статистично вірогідні відмінності відносно показника контрольної групи (\*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ );
- & - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин з СТЦ-діабетом (&& -  $p < 0,01$ , &&& -  $p < 0,001$ );
- # - статистично вірогідні відмінності відносно показника в групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін» (# -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,01$ , ### -  $p < 0,001$ ).

Введення модуляторів обміну  $H_2S$  модифікувало антиоксидантний потенціал метформіну за експериментального ЦД, а саме NaHS стимулював,

тоді як ППГ навпаки інгібував. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» рівні МДА та КГП в нирках були достовірно меншими відповідно на 19,0 та 33,5 % відносно тварин, які отримували лише метформін. Натомість у тварин, яким вводили ППГ зміни були протилежними: рівні МДА та КГП в нирках були достовірно більшими відповідно на 20,5 та 18,3 % відносно тварин, які отримували лише метформін.

#### **Резюме до розділу 4.**

Проведені дослідження засвідчили, що СТЦ-діабет супроводжувався порушенням функціонального стану нирок (поліурією, ретенційною азотемією, протеїнурією, зниженням клубочкової фільтрації та реабсорбції води), збільшенням секреції альдостерону та розладами іонорегуляторної функції нирок (зниження натрійурезу, збільшення екскреції калію з сечею), активацією патобіохімічного каскаду ураження нирок – запалення, апоптозу, фіброзу, оксидативного стресу.

Використання метформіну за ЦД викликало покращення функціонування тубулярного та гломерулярного апаратів нирок (знижується поліурія, ретенційна азотемія, протеїнурія та зростає клубочкова фільтрація та реабсорбція води), зменшувало секрецію альдостерону та електролітний дисбаланс, мало депримуєчий вплив на активність запалення, апоптозу, фіброзу та оксидативного стресу в нирках, що асоціювалось зі збільшенням запасів  $H_2S$  в нирках.

Застосування донору  $H_2S$  – NaHS потенціювало коригуючий вплив метформіну на функціональний стан нирок, іонорегуляторну функцію нирок, активність запалення, оксидативного стресу, апоптозу та фіброзу в нирках, тоді як введення інгібітору синтезу  $H_2S$  – ППГ вірогідно зменшувало ренопротекторні властивості метформіну.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [9, 11, 13, 15, 17, 135, 175, 213].

## РОЗДІЛ 5

ГІСТОЛОГІЧНА СТРУКТУРА НИРОК ЩУРІВ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ  
МЕТФОРМІНУ ТА ЙОГО КОМБІНАЦІЇ З МОДУЛЯТОРАМИ ОБМІНУ  $H_2S$   
ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

## 5.1. Структурна організація нирок щурів контрольної групи та за стрептозотоцин-індукованого діабету

При мікроскопічному дослідженні нирок щурів контрольної групи встановлені загальні закономірності їх структурної організації. Орган представлений кірковою та мозковою речовиною. В корі визначались чисельні нефрони, що включали ниркові тільця, проксимальні та дистальні каналці. Останні продовжувались в сполучні трубочки та збірні протоки. Ниркові тільця мали сферичну форму, побудовані із судинного клубочка та капсули. Зовнішня стінка капсули представлена одношаровим плоским епітелієм, що лежить на базальній мембрані, а внутрішня – включає подоцити. Сечовий простір, що розміщений між двома стінками капсули був не розширеним. Капіляри судинних клубочків мали ознаки помірно вираженого повнокрів'я. Проксимальні трубочки, що визначались навколо ниркових тілець, були забарвлені більш інтенсивно, ніж дистальні та займали переважну частину зрізів кіркової речовини. Стінки проксимальних трубочок зсередини вистилені одношаровим кубічним епітелієм, на апікальному полюсі якого спостерігали добре виражену щіточкову облямівку, а на базальному – складчасту облямівку. Дистальні трубочки займали меншу площу на зрізах, представлені одношаровим кубічним епітелієм, клітини якого мали світлу цитоплазму. Діаметр просвіту дистальних трубочок менший, ніж в проксимальних. Цитоплазма більшої частини епітеліоцитів дистальних каналців нефрона забарвлена оксифільно. Ядра їх розташовані на одному рівні, сферичні, нормохромні, містять добре структуровані ядерця. Сторонні включення в

просвітах проксимальних та дистальних трубочок в нирках інтактних щурів відсутні. Судини кровоносного мікроциркуляторного руслу в нирковій корі і мозковій речовині нирок мали притаманну їм структуру. Просвіти капілярів клубочка та перитубулярних кровоносних капілярів інтактних щурів були помірно повнокрівні (рис. 5.1).

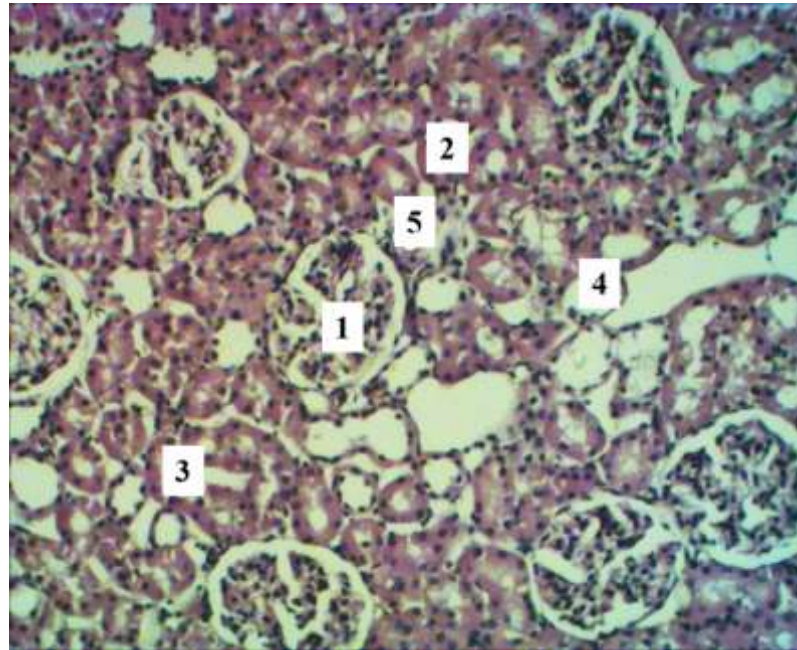


Рис. 5.1 Структурна організація кіркової речовини нирки тварини контрольної групи. Ниркові тільця (1), дистальні трубочки (2), проксимальні трубочки (3), просвіт лімфатичної судини (4), перитубулярні кровоносні капіляри (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 100$

В мозковій речовині нирок щурів контрольної групи розташовані петлі нефронів і збірні протоки. Стінки потоншених трубочок низхідної ніжки нефронів утворені плоскими епітеліоцитами, їх цитоплазма бліда. Стінки висхідної ніжки вистилені кубічними епітеліальними клітинами. Збірні протоки складала більшу частину зрізів мозкової речовини нирок та були вкриті зсередини одношаровим епітелієм (рис. 5.2).

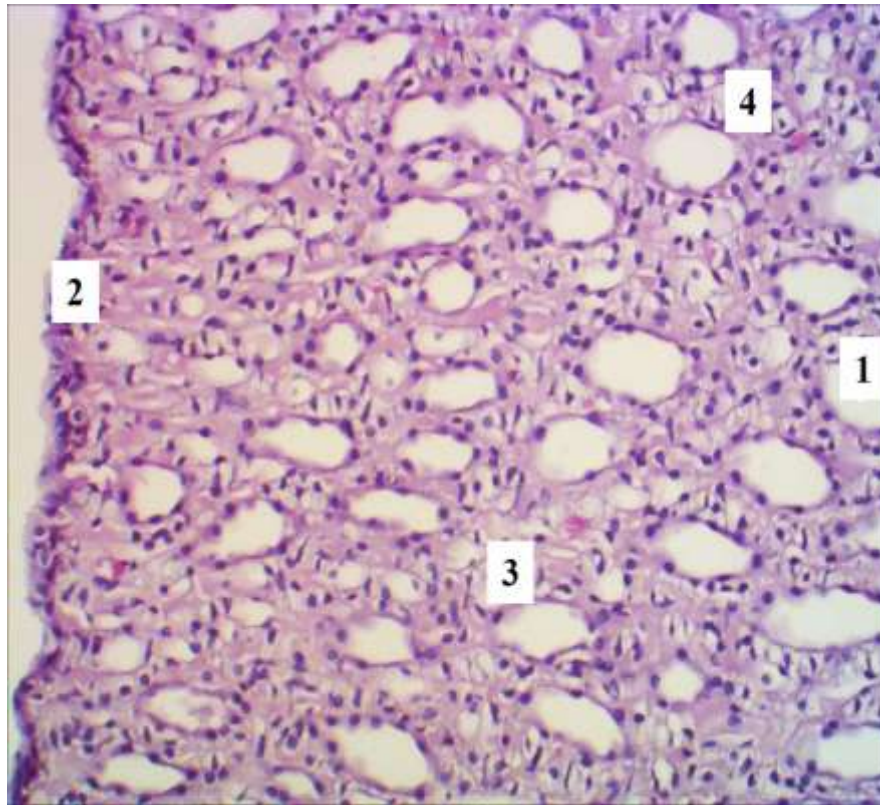


Рис. 5.2 Мікроскопічна будова мозкової речовини нирки тварини контрольної групи. Мозкові збірні протоки (1), уротелій (2), просвіт венули (3), перитубулярні кровоносні капіляри (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 100

При гістологічному дослідженні нирок щурів з експериментальним стрептозотоциновим цукровим діабетом на 28 добу дослідження виявили зміни в судинах мікроциркуляторного русла ниркових тілець, проксимальних і дистальних трубочок нефронів у вигляді їх вираженого повнокрів'я. Просвіти артеріол, розташованих на межі ниркової кори та мозкової речовини, звужені. Внутрішня еластична мембрана в них не однорідна, подекуди потовщена, розшарована. Наявне плазматичне просякання стінок артеріол та периваскулярний набряк інтерстицію (рис. 5.3).



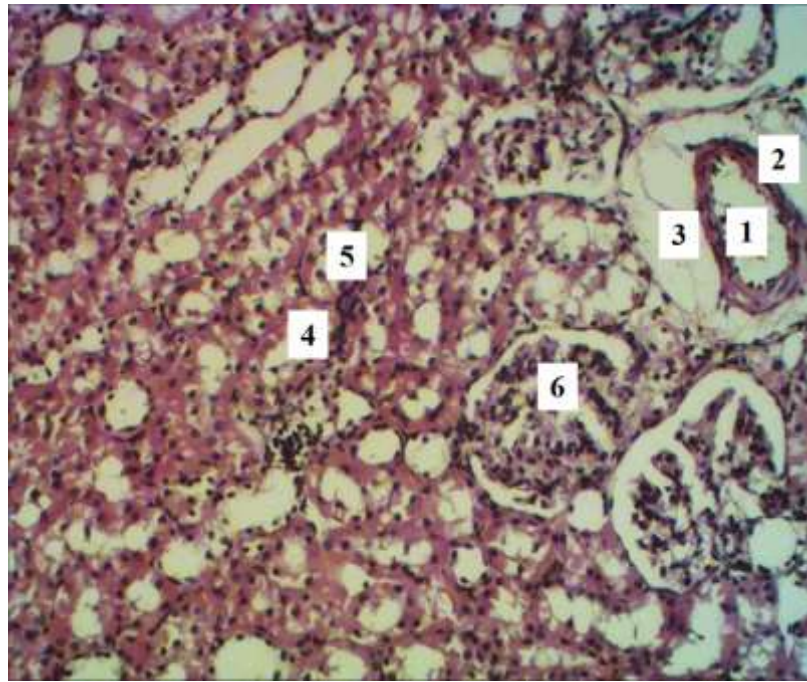


Рис. 5.3 Мікроскопічні зміни ниркової кори щура з експериментальним стрептозотоциновим діабетом на 28 добу. Пристінкові тромби в просвітах артеріол (1), плазматичне просочування (2), виражений периваскулярний набряк (3), некроз та вакуолярна дистрофія епітеліоцитів в стінках проксимальних трубочок (4), некроз та вакуолярна дистрофія в стінках дистальних трубочок (5), лейкоцитарна інфільтрація навколо клубочкових капілярних судин (6). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 100.

Ниркові тільця відрізнялись один від одного особливостями гістоструктури. Так, поряд з нечисельними нирковими тільцями, які за будовою подібні до таких у інтактних щурів, виявляли ті, що мали зморщені клубочки, значно розширені сечові простори, в яких був розміщений білковий детрит. Подекуди відмічали також наявність гіпертрофованих ниркових тілець. Навколо них виявляли виражену гістіолімфоцитарну інфільтрацію, гіпертрофію і гіперплазію фібробластів. Зовнішні стінки капсули клубочків були потовщені. Просвіти їх капілярних судин розширені, повнокрівні, а в деяких спостерігали стаз, крайове стояння, адгезію та діapedез лейкоцитів, складжі еритроцитів і тромби. Ендотеліоцити стінок клубочкових капілярів мали ознаки набряку, їх ядра виступали в просвіт судин. Базальна мембрана

була потовщена, набрякла. Відмічали наявність периваскулярних геморагій, гістіолімфоцитарної інфільтрації. Чисельність мезангіоцитів в клубочках щурів із стрептозотоциновим цукровим діабетом значно переважала таку у інтактних тварин (рис. 5.4).

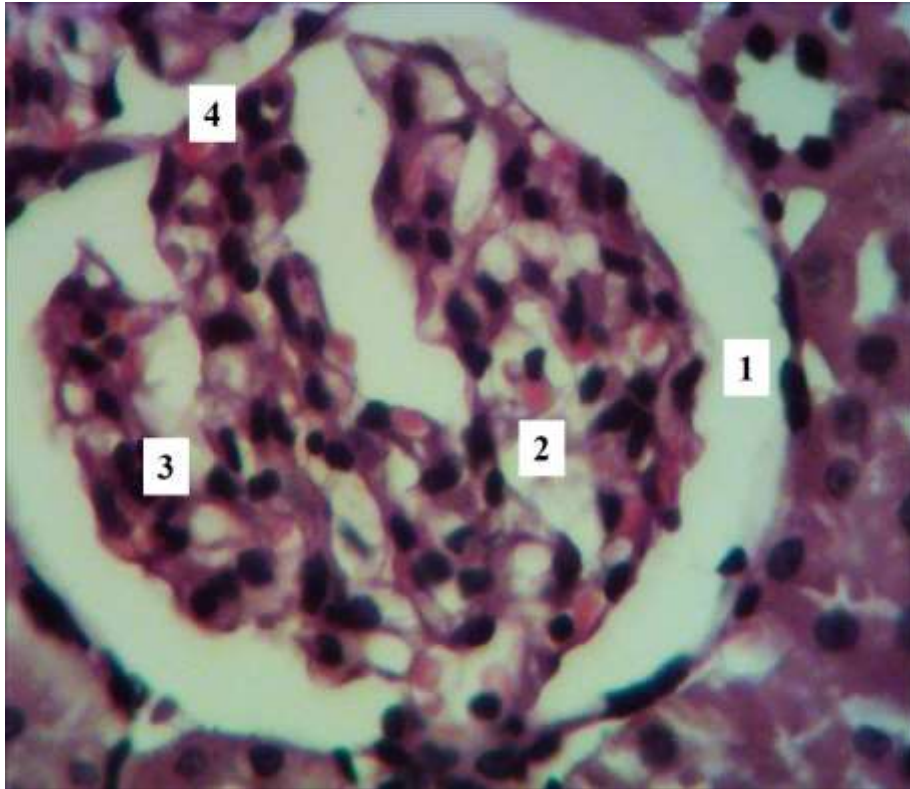


Рис. 5.4 Гістологічні зміни структурних елементів кіркової речовини нирки щура з експериментальним стрептозотоциновим діабетом на 28 добу. Розширені сечові просвіти (1), розширені просвіти і повнокрів'я клубочкових капілярних судин (2), вогнищева гіперплазія і гіпертрофія мезангіоцитів (3), ділянки адгезії петель капілярів до зовнішньої стінки капсули ниркового тільця (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 400.

Просвіти деяких проксимальних трубочок кіркової речовини нирок щурів із стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом були розширені, їх стінки утворені епітеліоцитами кубічної форми. Останні подекуди мали ознаки набряку у вигляді помутніння цитоплазми. Також клітини характеризувались зернистою, вакуолярною, гіаліново-крапельною

дистрофією, а щітчаста облямівка в більшій частині епітеліоцитів не виявлена. Просвіти проксимальних каналців були заповнені клітинним детритом. Навколо них виявляли виражений набряк інтерстицію (рис. 5.5).

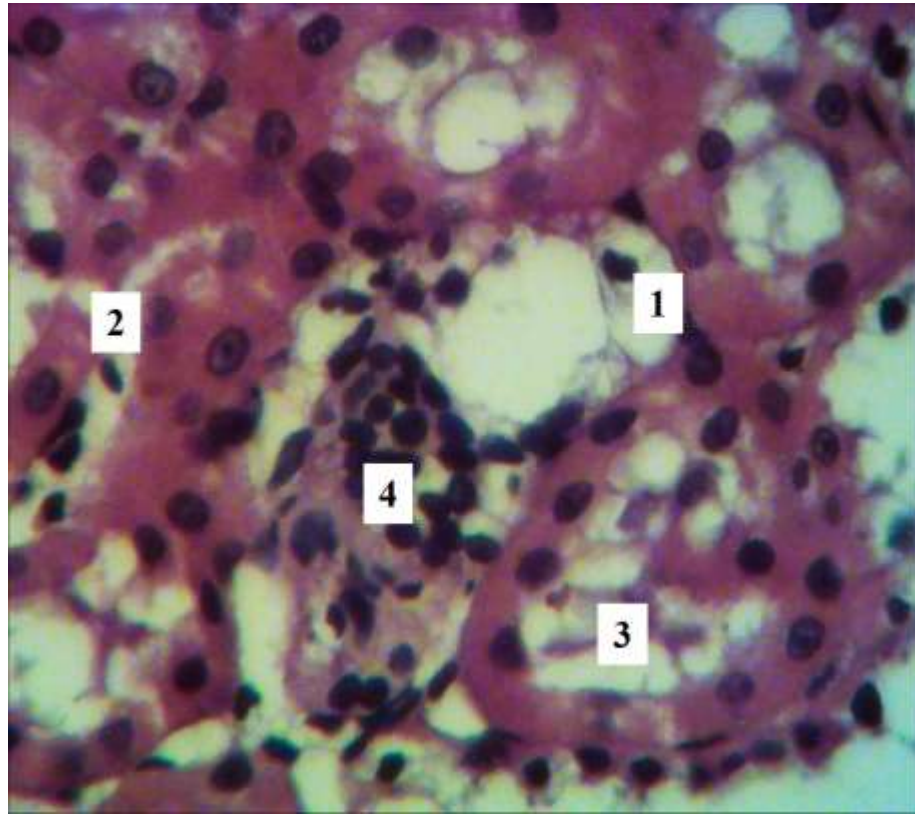


Рис. 5.5 Мікроскопічні зміни нирки щура з експериментальним стрептозотоциновим діабетом на 28 добу. Розширені просвіти перитубулярних капілярів (1), некроз та вакуолярна дистрофія епітеліоцитів в стінках проксимальних трубочок (2), некроз та вакуолярна дистрофія в стінках дистальних трубочок (3), вогнища некрозу та лейкоцитарної інфільтрації (4). Зabarвлення гематоксиліном та еозином. x 400.

Дистальні трубочки нефронів за даних умов були розширені, в порівнянні з такими у інтактних щурів. Їх стінки утворені епітеліоцитами, що мали меншу висоту, ніж у тварин групи контролю. В стінках деяких дистальних трубочок епітеліоцити були дистрофічно змінені, їх ядра темні, хроматин конденсований. В нирковій корі щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом також виявляли проксимальні і дистальні

трубочки, стінки яких були дезорганізовані, внаслідок десквамації епітеліального вистилення. Крім того, відмічали дисциркуляторні зміни в перитубулярних гемокапілярах. Так, поряд з повнокрівними судинами із розширеними просвітами, траплялись капіляри, просвіти яких значно звужені. Навколо зазначених судин та дистальних трубочок нефронів виявляли гістіолімфоцитарну інфільтрацію та набряк інтерстицію, які також є наслідком порушення проникності стінок гемокапілярів. (рис. 5.6).

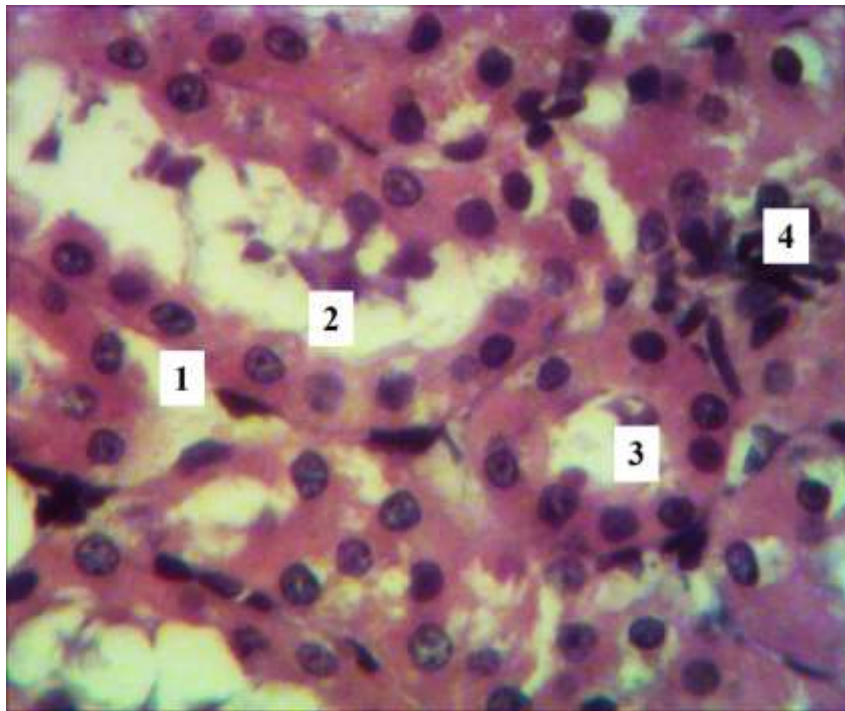


Рис. 5.6 Морфологічна організація ниркової кори щура з експериментальним стрептозотоциновим діабетом на 28 добу. Просвіти перетубулярних капілярів (1), некроз та вакуолярна дистрофія епітеліоцитів в стінках проксимальних трубочок (2), некроз та вакуолярна дистрофія в стінках дистальних трубочок (3), вогнища некрозу та лейкоцитарної інфільтрації (4). Збарвлення гематоксиліном та еозином. x400.

## 5.2 Вплив метформіну та його комбінації з NaHS і пропаргілгліцином на структурну організацію нирок щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету

У щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким для корекції вводили метформін, патологічний процес охоплював всі структури в корі та мозковій речовині нирок, однак зміни були менш виражені, ніж у тварин без корекції (рис. 5.7-5.8).

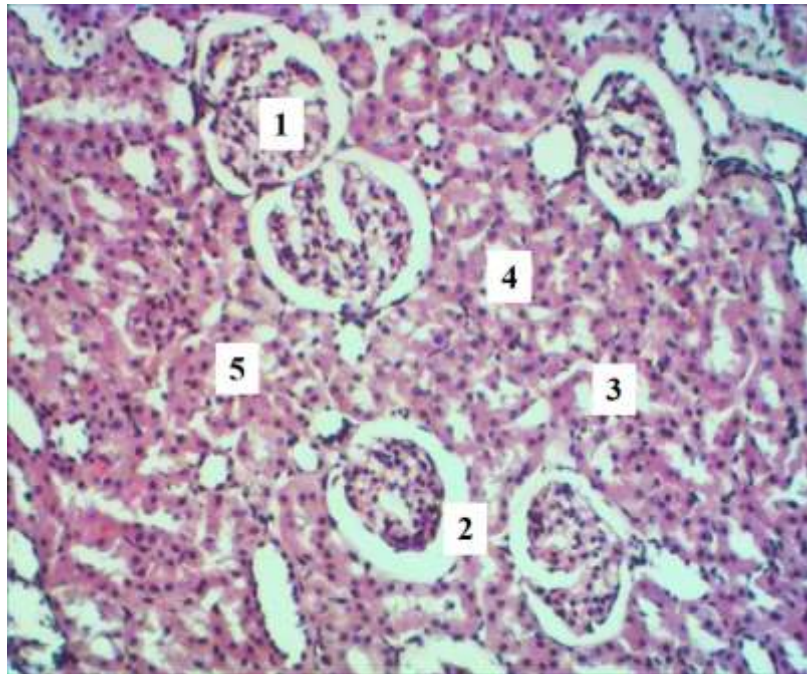


Рис. 5.7 Мікроскопічні зміни ниркової кори щурів з експериментальним діабетом на 28 добу дослідження, яким для корекції вводили метформін. Гіпертрофовані ниркові тільця (1), розширені сечові простори (2), дистальні трубочки нефронів (3), проксимальні трубочки нефронів (4), перитубулярні кровоносні капіляри (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 100.

Більшість ниркових тілець за будовою подібні до таких у інтактних щурів. В деяких ниркових тільцях ми відмітили незначне розширення сечового простору. Просвіти капілярів клубочка також розширені, однак повнокрів'я в них не виражене, на відміну від щурів, яким вводили лише

стрептозотонин. Стінки більшої частини судин були суцільними, ендотеліоцити мали типову структуру. Навколо капілярів клубочка виявляли поодинокі лімфоцити і макрофаги. Клубочки, в яких наявні вогнища геморагії зустрічались на гістологічних препаратах значно рідше, ніж у щурів без корекції. Ми також відмітили незначну гіперплазію та гіпертрофію мезангіоцитів в деяких ниркових тільцях.

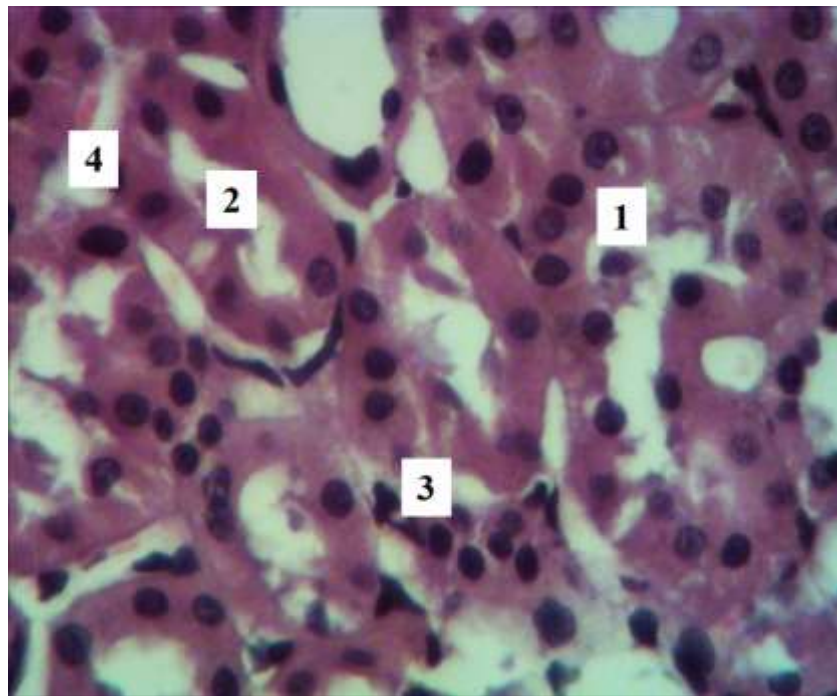


Рис. 5.8. Гістологічна будова ниркової кори щурів з експериментальним діабетом на 28 добу дослідження, яким для корекції вводили метформін. Вакуолярна дистрофія епітеліоцитів в стінках проксимальних трубочок (1), вакуолярна дистрофія епітеліоцитів в стінках дистальних трубочок (2), вогнища лейкоцитарної інфільтрації (3), просвіти перетубулярних капілярів (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 400.

В проксимальних звивистих і прямих трубочках нефронів більша частина епітеліоцитів мали світлу цитоплазму. Ядра цих клітин володіли гофрованою поверхнею з численними інвагінаціями каріолеми, ядерця в них були добре структуровані. Подекуди виявляли проксимальні звивисті

трубочки, в яких епітеліоцити мали ознаками зернистої дистрофії, однак їх було значно менше, ніж у щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом, яким не проводили корекцію. В нирковій корі перитубулярний набряк інтерстицію і гістіолімфоцитарна інфільтрація були менше виражені, ніж у тварин, що отримували лише стрептозотонин. В дистальних трубочках відмічали наявність незначної кількості епітеліоцитів з ознаками вакуолярної і зернистої дистрофії. Просвіти більшої частини дистальних трубочок не розширені. В периваскулярних просторах виявляли поодинокі нейтрофільні лейкоцити та еозинофіли. В інтерстиції ниркової кори та мозкової речовини нирок були наявні гіпертрофовані фібробласти.

У щурів з експериментальним цукровим діабетом, яким на тлі дії стрептозотонину вводили метформін в комбінації з інгібітором синтезу гідроген сульфід пропаргілгліцином, структурні пошкодження в нирковій корі і мозковій речовині нирок були більше виражені, ніж у тварин, що отримували лише метформін (рис. 5.9-5.10).

Судини кровоносного мікроциркуляторного русла в нирковій корі і мозковій речовині нирок повнокрівні. Просвіти артеріол звужені, внутрішня еластична мембрана в них не однорідна, подекуди потовщена, розшарована. Однак просякання стінок артеріол та периваскулярний набряк інтерстицію менше виражені, ніж у щурів без корекції. Ниркові тільца зі зморщеними та гіпертрофованими клубочками і значно розширеними сечовими просторами, виявляли частіше, ніж у тварин, яким для корекції вводили лише метформін. Гістіолімфоцитарна інфільтрація, гіпертрофія та гіперплазія фібробластів навколо ниркових тілець були яскраво вираженими. Відмічали розширення просвітів капілярів клубочка. В стінках їх ендотеліоцити володіли ознаками гідропічної дистрофії, спостерігали явище так званих «голих ядер». Базальна мембрана капілярів клубочка потовщена, набрякла. Гістіолімфоцитарна інфільтрація та набряк інтерстицію, а також гіперплазія мезангіоцитів навколо клубочкових капілярних судин були більш виразні, ніж у тварин з експериментальним цукровим діабетом, яким вводили лише метформін.

Частина сечових просторів є розширеною, всередині них наявні фібрин і білковий вміст. Однак відмічали також ниркові тільця зі звуженим сечовим простором, що вказує на порушення фільтраційних процесів в нирках.

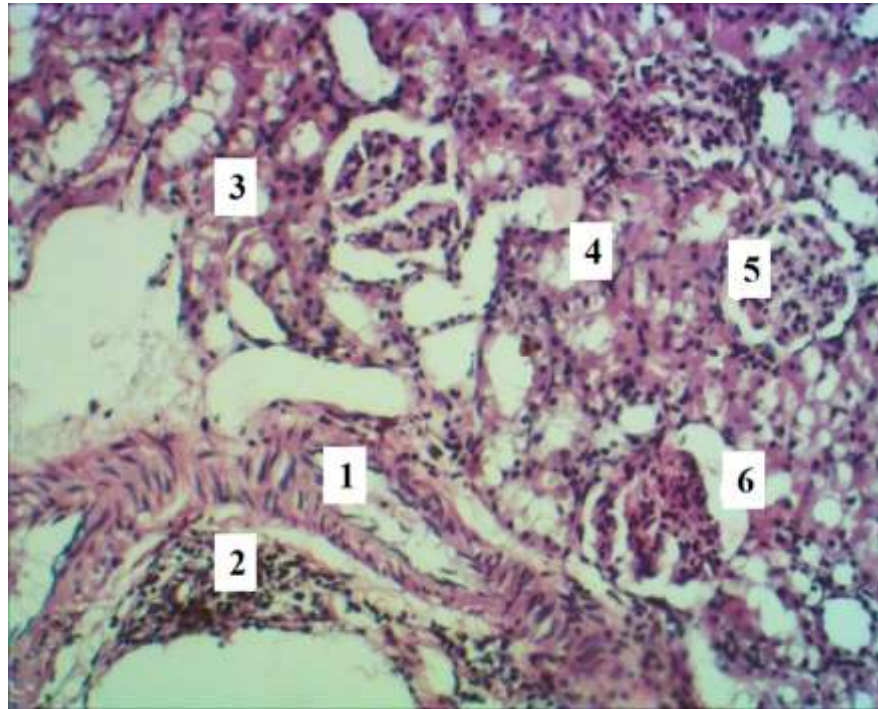


Рис. 5.9 Мікроскопічні зміни ниркової кори щурів з експериментальним діабетом на 28 добу дослідження, які отримували метформін та пропаргілгліцин. Пристінкові тромби в просвітах артеріол (1), повнокровні просвіти венул (2), розширені просвіти проксимальних трубочок (3), вакуолярна дистрофія епітеліоцитів в стінках проксимальних трубочок (4), звужені сечові простори (5), розширені сечові простори (6). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 100.

Просвіти деяких проксимальних трубочок були розширені, містили десквамовані епітеліоцити та білковий детрит. В клітинах стінок проксимальних трубочок нефронів спостерігали вакуолярну та гіаліново-крапельну дистрофію цитоплазми. Навколо них визначався набряк інтерстицію. Просвіти дистальних трубочок також розширені. В деяких з них епітеліоцити були дистрофічно та некротично змінені. Слід зазначити, що



подекуди визначались проксимальні і дистальні трубочки з порушенням цілісності їх стінок. В просвітах таких каналців знайдено білковий і клітинний детрит. Також виявлено дисциркуляторні зміни в перитубулярних гемокапілярах. Навколо останніх та трубочок нефронів спостерігали гістіолімфоцитарну інфільтрацію, інтерстиційний набряк. Просвіти лімфатичних капілярів в кірковій і мозковій речовині були значно розширені, містили лімфоцити та клітинний детрит.

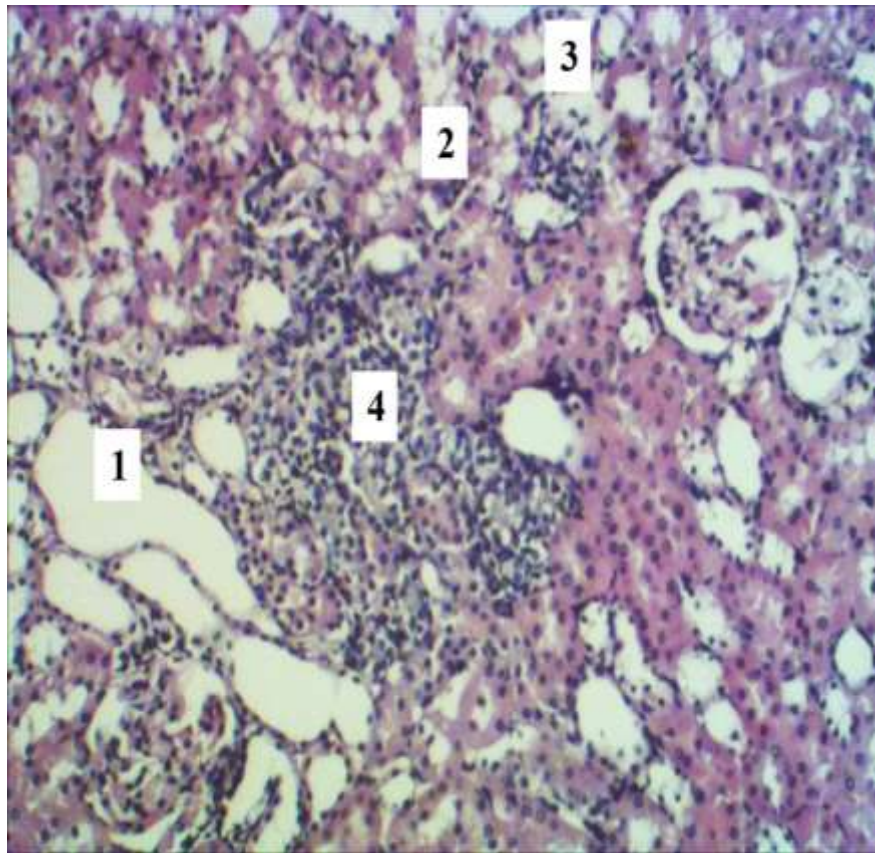


Рис. 5.10 Гістологічна організація кіркової речовини нирок щурів з експериментальним діабетом на 28 добу дослідження, яким для корекції вводили метформін та пропаргілгліцин. Розширені просвіти перетубулярних капілярів (1), некроз та вакуолярна дистрофія епітеліоцитів в стінках проксимальних трубочок (2), некроз та вакуолярна дистрофія в стінках дистальних трубочок (3), вогнища некрозу та лейкоцитарної інфільтрації (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 100.

При мікроскопічному дослідженні нирок щурів з стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом, яким вводили метформін у поєднанні з донором гідроген сульфідом NaHS, виявилось, що станом на 28 добу структурні пошкодження нирок були найменш виразними (рис. 5.11-5.13). Вони характеризувались помірним розширенням просвітів та повнокрів'ям. На відміну від щурів з стрептозотоциновим діабетом без корекції, в даній групі тварин, артеріоли мали загальні закономірності будови. Ділянок набряку, розшарування, плазматичного просякання стінок та набряку інтерстицію не виявлено.

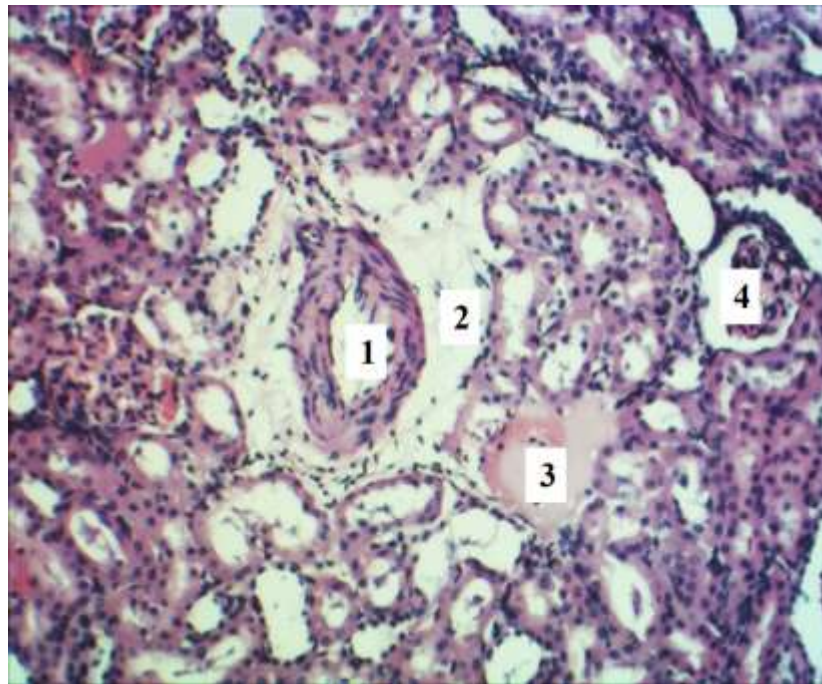


Рис. 5.11 Гістологічна будова кіркової речовини нирок щурів з експериментальним діабетом на 28 добу дослідження, яким для корекції вводили NaHS та метформін. Просвіт артеріоли (1), периваскулярний простір (2), просвіт венули (3), ниркове тільце (4). Зabarвлення гематоксиліном та еозином. x 100.

Переважає більшість ниркових тілець у щурів, що отримували для корекції NaHS та метформін за умов стрептозотоцинового діабету, володіли особливостями морфологічної організації, що близька до такої у тварин групи

контролю. Однак, траплялись поодинокі зморщені або гіпертрофовані тільця. Гістіолімфоцитарна інфільтрація навколо них була помірно вираженою. Окремі капіляри клубочка характеризувались розширенням їх просвітів, що містили лейкоцити. Ендотеліальний шар стінок капілярів клубочка та їх базальна мембрана були суцільними. На відміну від щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом, яким не проводили корекції, у тварин, що отримували NaHS та метформін, геморагії, гістіолімфоцитарної інфільтрації, набряку інтерстицію, а також гіперплазію мезангіоцитів навколо судин не виявляли. Сечові простори в гіпертрофованих ниркових тільцях щурів, що отримували NaHS та метформін були розширені, однак не містили фібрину і білкового детриту.

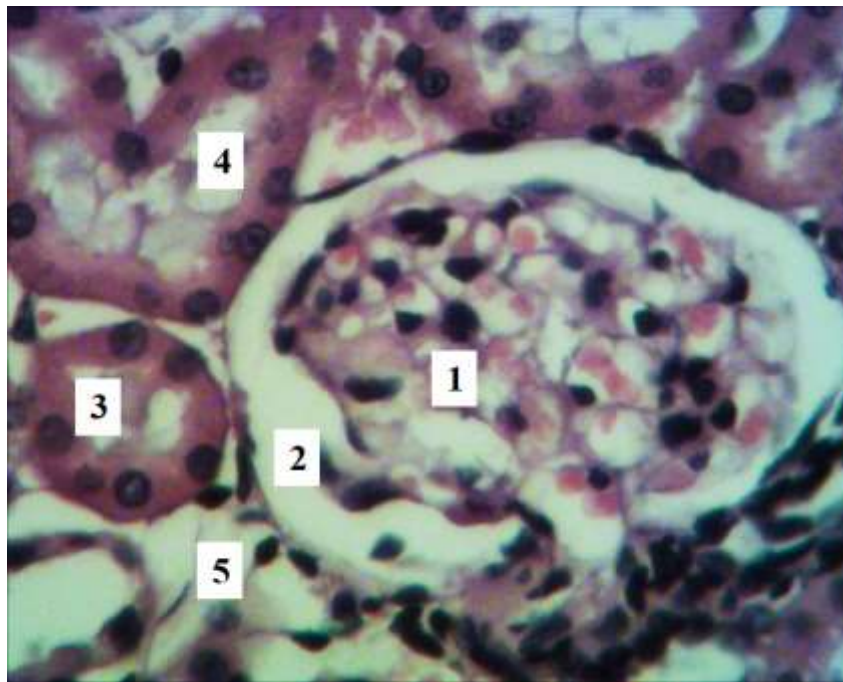


Рис. 5.12 Гістологічна організація ниркової кори щурів з експериментальним діабетом на 28 добу дослідження, яким для корекції вводили NaHS та метформін. Розширені просвіти капілярів клубочка (1), сечовий просвіт (2), просвіт проксимальної трубочки (3), просвіт дистальної трубочки (4), просвіт перитубулярного капіляра (5). Зabarвлення гематоксиліном та еозином. x400.

На відміну від щурів з стрептозотоцин-індукованим діабетом, яким не проводили корекції, у тварин, що отримували NaHS і метформін, стінки проксимальних і дистальних трубочок нефронів були цілісними, а ознаки десквамації епітеліоцитів виражені мінімально. Просвіти деяких проксимальних трубочок розширені, їх стінки утворені епітеліоцитами кубічної форми з добре забарвленими ядрами і світлою цитоплазмою. Щіточкова облямівка наявна в більшій частині епітеліальних клітин проксимальних каналців.

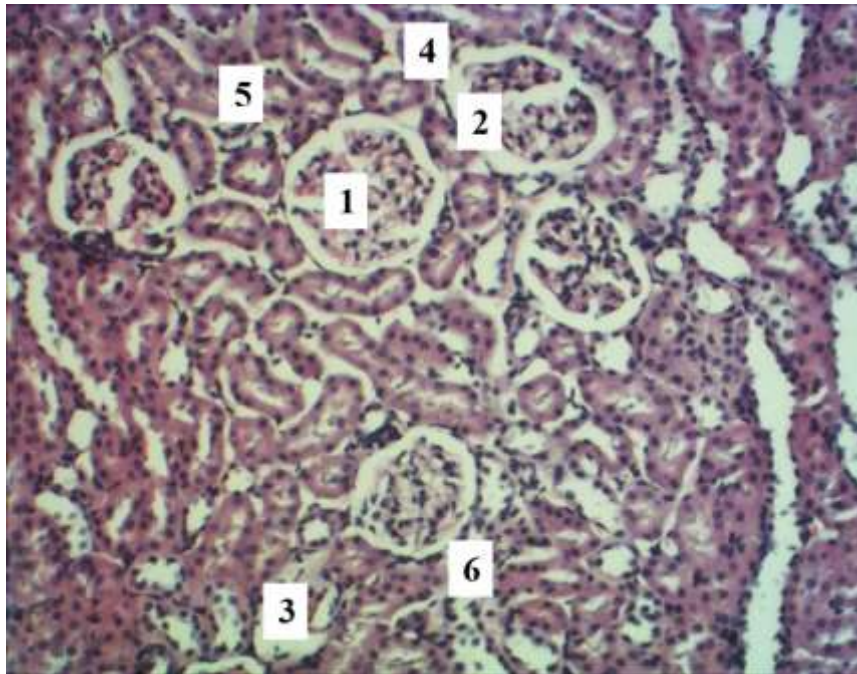


Рис. 5.13 Мікроскопічна організація кіркової речовини нирок щурів з експериментальним діабетом на 28 добу дослідження, яким для корекції вводили NaHS та метформін. Гіпертрофовані ниркові тільця (1), сечові простори (2), зморщені ниркові тільця (3), дистальні трубочки (4), проксимальні трубочки (5), перитубулярні кровоносні капіляри (6). Забарвлення гематоксиліном та еозином. x100.

Гістіолімфоцитарна інфільтрація та інтерстиційний набряк навколо перитубулярних судин був відсутнім, що, ймовірно, є проявом нормалізації судинної проникності. Просвіти лімфатичних капілярів в кірковій і мозковій

речовині нирок в даній групі тварин були значно розширені, в них виявляли лімфоцити.

### **Резюме до розділу 5.**

Проведені гістологічні дослідження нирок щурів із стрептозотоциновим цукровим діабетом на 28 добу експерименту встановили наявність компенсаторно-приспосувальних змін всіх структурних елементів органу. Слід зазначити, що більшість морфологічних знахідок за даних умов носили незворотній характер. Найбільшу увагу привертала зміна гістоструктури судин: порушення цілісності епітеліального вистилення стінок капілярів клубочка, набряк ендотеліоців. Крім того, спостерігали наявність периваскулярних геморагій та гістіолімфоцитарної інфільтрації, що є свідченням порушення цілісності стінок капілярів клубочка та проникності фільтраційного бар'єру. Поряд з цим відмічали ознаки вираженого нефросклерозу - чисельні зморщені і гіпертрофовані ниркові тільця з розширеними сечовими просторами, виражена гіпертрофія та гіперплазія фібробластів навколо ниркових тілець, зростання кількості мезангіальних клітин. Реєструвались яскраво виражені гістіолімфоцитарна інфільтрація та набряк інтерстицію. Проксимальні та дистальні каналці нефронів характеризувались дистрофічними і некробіотичними змінами клітин їх епітеліального шару.

У щурів, які на тлі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету, отримували метформін, спостерігали позитивні зміни особливостей будови структурних елементів нирок, в порівнянні з нелікованими тваринами. Зокрема, зростала кількість ниркових тілець, схожих на такі в інтактних щурів, зменшувались ознаки нефросклерозу. Ендотеліальний шар капілярів клубочка характеризувався неперервністю організації, клітини його мали типову будову. Менш вираженими були гістіолімфоцитарна інфільтрація та набряк інтерстицію. Проксимальні та дистальні каналці нефронів характеризувались помірними дистрофічними змінами.

За використання комбінації метформіну з пропаргілгліцином на тлі експериментального діабету відмічались більш виразні гістологічні зміни в нирках, порівняно з тваринами, лікованими лише метформін. Спостерігали розширення та повнокрів'я судин мікроциркуляторного русла. Ознаки нефросклерозу були більш виразними, ніж за умов лікування метформіном. Поглиблювалась гістіолейкоцитарна інфільтрація паренхіми органу. Ендотеліоцити стінок капілярів клубочка були дистрофічно зміненими, ядра їх виходили в просвіт судин. Епітеліальні клітини стінок проксимальних і дистальних каналців нефрона підлягали десквамації, а деякі з них були зруйнованими, залишки їх виходили всередину просвітів цих каналців.

Використання комбінації метформіну з NaHS мало найбільш позитивний вплив на структурні зміни в нирках за стрептозотоцин-індукованого діабету. Більшість судин за даних умов були помірно повнокрівні, в порівнянні з тваринами, що отримували лише метформін та у щурів з експериментальним діабетом без корекції. Ниркові тілця володіли близькою до норми будовою, ознаки нефросклерозу були мінімальними. Ендотеліальне вистилення стінок капілярів клубочка було суцільним. Стінки проксимальних та дистальних каналців нефронів були цілісними. Спостерігали ознаки нормалізації судинної проникності, що проявлялись у вигляді відсутності інтерстиційного набряку, геморагій. Значно зменшувався ступінь гістіолімфоцитарної інфільтрації.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [14].

## РОЗДІЛ 6

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Діабетична нефропатія є актуальною медико-соціальною проблемою через велику поширеність, швидкий розвиток серцево-судинних ускладнень та термінальної ниркової недостатності, що асоціюється з високою інвалідизацією та смертністю пацієнтів [102]. Важливим питанням сьогодення є пошук лікарських препаратів, які не лише ефективно контролювали рівень глікемії, але й виявляли ренопротективні властивості, зменшували прогресування хронічної хвороби нирок, ризик розвитку кардіо-васкулярних ускладнень та знижували смертність пацієнтів.

На сьогодні препаратом першої лінії в лікуванні цукрового діабету (ЦД) 2 типу є цукрознижуючий засіб із групи бігуанідів метформін [1]. В крупному проспективному дослідженні (The United Kingdom Prospective Diabetes Study) показано, що тривале використання метформіну у пацієнтів з ЦД 2 типу супроводжується зменшенням ризику розвитку інфаркту міокарду (на 33 %), інсульту (на 20 %) та мікрovasкулярних ускладнень, в тому числі ниркової недостатності (на 16 %) [85]. У пацієнтів з хронічною хворобою нирок та ЦД 2 типу метформін досить добре контролює рівень глікемії, швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ) та мікроальбумінурію [102, 132]. В багатьох проспективних клінічних дослідженнях застосування метформіну у пацієнтів з діабетичною нефропатією асоціювалось зі зниженням загальної та кардіо-васкулярної смертності, ризику серцево-судинних ускладнень та розвитку термінальної ниркової недостатності [50, 108, 109, 131].

Перспективним напрямком досліджень є оптимізація фармакотерапії діабетичної нефропатії метформіном на основі вивчення нових механізмів ренопротективної дії у цього препарату. Останнім часом активно вивчається вплив сигнальної молекули  $H_2S$  на функціонування нирок за ЦД [178]. Встановлено, що використання донорів  $H_2S$  (натрій гідрогенсульфіду  $NaHS$ )

покращує функціональний стан нирок за експериментального діабету - зменшує мікроальбумінурію, ретенційну азотемію, посилює фільтраційну функцію нирок, зменшує гіперактивацію ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) [117, 160, 207]. Однак, залишається невивченим питання щодо причетності системи  $H_2S$  до реалізації нефропротекторної активності метформіну. Не досліджений також вплив модуляторів обміну  $H_2S$  на основні прояви нефропротекторної дії метформіну за цукрового діабету.

Метою дисертаційного дослідження було оцінити роль системи  $H_2S$  в молекулярних механізмах нефропротекторної дії метформіну за експериментального цукрового діабету і на цій основі патогенетично обґрунтувати нові підходи до корекції діабетичної нефропатії

Досліди проведені на 125 білих нелінійних щурах-самцях масою тіла 200-240 г. Всі етапи досліджень виконані за загальними етичними принципами експериментів на тваринах згідно Першого національного конгресу України з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», що було засвідчено комісією з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол №8 від 25.10.2018, протокол №4 від 18.05.2023). В ході експерименту усі піддослідні тварини поділені на п'ять груп. Перша група – контрольна, отримували інтраперитонеально 0,1 М цитратний буфер з рН 4,5 (0,1 мл/ 100 г маси). В другій, третій та 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. В такій дозі стрептозотозин викликав стійку гіперглікемію, яка не супроводжувалась діабетичним кетоацидозом [116]. Через дві доби після ін'єкції стрептозотоцину визначали рівень глюкози в периферичній крові і для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії більше 16 ммоль/л. З 3-ої по 28-му добу 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). Щурам 4-ої групи поряд з метформіном вводили донор  $H_2S$  -  $NaHS \cdot H_2O$  (Sigma, США) у дозі 56 мкмоль/кг 1 раз на добу інтраперитонеально. Щурам 5-ої групи поряд з метформіном вводили інгібітор синтезу  $H_2S$  - D,L-пропаргілгліцин (ППГ, Sigma, США) у дозі 442 мкмоль/кг маси 1 раз на добу інтраперитонеально. Дози, шляхи та тривалість введення метформіну,  $NaHS$  та ППГ були запозичені з літератури при проведенні подібних експериментальних досліджень [84, 130].

***Дослідження рівня глікемії та стану системи  $H_2S$  в нирках щурів на тлі застосування метформіну та його комбінації з модуляторами обміну  $H_2S$  за СТЦ-діабету (розділ 3).***

Виявилось, що станом на 28 добу після одноразового введення стрептозотоцину реєструвалось вірогідне зростання рівня глюкози в крові у 4,6 рази ( $p < 0,001$ ) відносно контролю. Поряд з цим відмічались пертурбації в системі  $H_2S$  в нирках, які характеризувались зниженням вмісту  $H_2S$  на 33,2 % ( $p < 0,001$ ), зменшенням швидкості синтезу  $H_2S$  в реакціях, каталізованих ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ/3-МСТ відповідно на 58,1; 37,8 та 45,3 % ( $p < 0,001$ ), зростанням швидкості утилізації  $H_2S$  на 79,4 % ( $p < 0,001$ ) та падінням активності ТРР на 38,8 % ( $p < 0,001$ ), порівняно з показниками контрольної групи. За цих умов також відмічалось зменшення  $H_2S$ -індукованої вазодилатації ниркових артерій. У групі тварин «СТЦ-діабет» відмічалось зміщення кривої «доза-ефект» праворуч відносно такої у групі контролю, показник середньоефективної концентрації  $H_2S$  у нирковій артерії за середньою величиною був достовірно більшим у 2,27 рази ніж у контролі.

Застосування метформіну супроводжувалось достовірним зменшенням рівня глікемії на 25,2 % ( $p < 0,001$ ), збільшенням рівня  $H_2S$  та активності ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ/3-МСТ відповідно на 27,9; 60,0; 18,6 та 27,9 % ( $p < 0,001$ ), зменшенням швидкості утилізації  $H_2S$  на 32,7 % ( $p < 0,001$ ) та зростанням активності ТРР на 15,2 % ( $p < 0,05$ ), відносно нелікованих тварин. Поряд з цим

фармакотерапія метформіном викликала зменшення депримуючого впливу ЦД на стимульовану  $H_2S$  дилатацію ниркових артерій: реєструвалось зміщення кривої «доза-ефект» ліворуч відносно такої у нелікованих тварин з ЦД, показник середньоефективної концентрації  $H_2S$  у нирковій артерії за середньою величиною був статистично вірогідно меншим на 22,8 % ніж у нелікованих тварин.

Таким чином, одноразове введення стрептозотоцину спричиняло розвиток гіперглікемії, що супроводжувалось формуванням дефіциту  $H_2S$ , зменшенням  $H_2S$ -продукуючої активності ЦГЛ, ЦБА, ЦАТ / 3-МСТ, зростанням швидкості утилізації  $H_2S$ , зниженням здатності  $H_2S$  депонуватись у формі персульфідів за участі TRP, а також зменшенням чутливості ниркових артерій до вазодилатуючої дії  $H_2S$ . Отримані результати знаходять своє підтвердження в літературі при проведенні подібних досліджень [37, 70, 178].

Використання метформіну виявляло потужну гіпоглікемічну активність та зменшувало пертурбації метаболізму  $H_2S$  в нирках: вірогідно зростав рівень  $H_2S$ ,  $H_2S$ -продукуюча активність ЦГЛ, ЦБА, ЦАТ / 3-МСТ, зменшувалась швидкість утилізації  $H_2S$ , підвищувалась активність TRP та зростала  $H_2S$ -індукована вазодилатація ниркових артерій. В літературі нами знайдено лише дві публікації щодо впливу метформіну на рівень  $H_2S$ . Так, за даними Wiliński B. et al. (2013) у інтактних щурів застосування метформіну вірогідно збільшує рівень  $H_2S$  в мозку, серці, нирках та печінці [196]. В роботі Hussain Lodhi A. et al. (2021) показано, що використання метформіну за експериментального ЦД достовірно збільшує запаси  $H_2S$  в нирках [92]. В той же час на сьогодні відсутні літературні дані щодо впливу метформіну на активність, експресію  $H_2S$ -синтезуючих ензимів, швидкість його деградації та депонування в нормі та за цукрового діабету.

Проведений нами кореляційний аналіз надав докази того, що вплив метформіну на метаболізм  $H_2S$  в нирках та чутливість ниркових артерій до дії  $H_2S$  супрятий з його гіпоглікемічною активністю. За цих умов між рівнем глюкози в сироватці крові та рівнем  $H_2S$ , активністю  $H_2S$ -продукуючих

ензимів, активністю TPR та чутливістю ниркових артерій до дії  $H_2S$  виникали обернені кореляції ( $r = -(0,60-0,8)$ ,  $p < 0,001$ ), а з швидкістю утилізації  $H_2S$  – прямі кореляції ( $r = 0,65$ ,  $p < 0,001$ ). Існування взаємозв'язку між рівнем глікемії та метаболізмом  $H_2S$  підтверджується також даними літератури. В популяційних дослідженнях показано наявність тісної асоціації між високим рівнем глікемії, порушенням толерантності до глюкози та низьким сироватковим рівнем  $H_2S$  [35]. Поряд з 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 та гломерулярних подоцитів мишей з високими концентраціями глюкози супроводжувалась зниженням  $H_2S$ -продукуючої активності ЦГЛ, а інкубація ендотеліальних клітин клубочків – зниженням експресії ЦГЛ та ЦБС [39, 49, 58, 107, 121].

Застосування модуляторів обміну  $H_2S$  модифікувало гіпоглікемічну активність метформіну та його вплив на обмін  $H_2S$  в нирках за СТЦ-діабету. Введення донору  $H_2S$  – NaHS посилювало гіпоглікемічну активність метформіну та його здатність коригувати обмін  $H_2S$  в нирках, тоді як використання інгібітору ППГ виявляло протилежний ефект.

В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» відмічалось зменшення рівня глюкози в крові на 17,9 % ( $p < 0,001$ ), швидкості утилізації  $H_2S$  в нирках на 16,1 % ( $p < 0,05$ ), а також збільшення вмісту  $H_2S$ , активності ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ/3-МСТ, TPR у нирках відповідно на 13,5; 38,3; 32,0; 30,2 та 27,6 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з тваринами, яким проводили монотерапію метформіном. За цих умов реєструвалось зростання  $H_2S$ -ініційованої вазодилатації ниркової артерій доказом чого було зміщення кривої «доза-ефект» ліворуч відносно такої при монотерапії метформіном та зменшенням середньоефективної концентрації  $H_2S$  у нирковій артерії на 29,5 % порівняно з групою тварин, лікованих лише метформіном:

Використання пропаргілгліцину супроводжувалось вірогідним зростанням вмісту глюкози в крові на 23,2 % ( $p < 0,001$ ), швидкості утилізації

$H_2S$  в нирках на 41,7 % ( $p < 0,001$ ), а також зменшенням рівня  $H_2S$ , активності ЦГЛ, ЦБС та ЦАТ/3-МСТ, ТРР у нирках відповідно на 19,5; 38,7; 12,2; 16,2 та 12,9 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з тваринами, яким проводили монотерапію метформіном. Також відмічалось вірогідне зниження чутливості ниркової артерії до вазодилатуючої дії  $H_2S$  - крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч, середня величина середньоелективної концентрації  $H_2S$  у нирковій артерії була достовірно більшою на 18,6 % ніж у тварин, лікованих лише метформіном

Отримані нами результати щодо впливу пропаргілгліцину та NaHS на обмін  $H_2S$  знаходять своє підтвердження в літературі [178]. В той же час літературні дані щодо впливу системи  $H_2S$  на метаболізм глюкози досить суперечливі. Показано, що  $H_2S$  пригнічував секрецію інсуліну  $\beta$ -клітинами підшлункової залози через активацію  $K_{ATP}$ -каналів і збільшував гіперглікемію, тоді як пропаргілгліцин навпаки виявляв гіпоглікемічну активність [78]. В інших дослідженнях встановлено, що ведення донорів  $H_2S$  зменшувало інсулінорезистентність скелетних м'язів та жирової тканини, збільшувало експресію транспортера ГЛЮТ-4 та захоплення тканинами глюкози, знижувало рівень глікемії [202, 215]. Існують дані, що у мишей нокаутованих по гену ЦГЛ зростає інсулінорезистентність скелетних м'язів [201]. В 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 [151, 225]. В роботі Dugbartey G.J. et al. (2022) показано, що застосування інгібітору синтезу  $H_2S$  підвищувало рівень глікемії, індекс НОМА і не впливало на рівень інсуліну [62]. Ймовірно, 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 за СТЦ-діабету.

***Дослідження показників функціонування нирок у щурів на тлі застосування метформіну та його комбінації з модуляторами обміну  $H_2S$  за СТЦ-діабету (розділ 4.1).***

Експериментальний ЦД, ініційований одноразовим введенням стрептозотоцину, викликав розвиток поліурії (діурез зростав в 1,72 рази,  $p < 0,001$ , порівняно з контролем), ретенційної азотемії (креатинін сироватки крові збільшувався в 2,6 рази,  $p < 0,001$ ), протеїнурії (екскреція білку з сечею зростала в 2,4 рази,  $p < 0,001$ ), 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.

Дослідження іонорегуляторної функції нирок показало, що СТЦ-діабет викликав зростання в сироватці крові альдостерону (в 2 рази,  $p < 0,001$ ), що супроводжувалось зменшенням натрійурезу (на 39,1 %,  $p < 0,001$ ), зростанням екскреції калію з сечею (на 20,3 %,  $p < 0,001$ ) та зменшенням співвідношення  $Na^+ / K^+$  сечі (на 49,4 %,  $p < 0,001$ ) порівняно з контролем. Застосування метформіну в значній мірі попереджувало ініційовані стрептозотоцином порушення секреції альдостерону та іонорегуляторної функції нирок. За цих умов відмічалось 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  $Na^+ / K^+$  сечі на 18,6 та 28,4 % ( $p < 0,001$ ), порівняно з нелікованими тваринами.

Отже, СТЦ-діабет супроводжувався порушенням функціонального стану нирок (поліурією, ретенційною азотемією, протеїнурією, зниженням клубочкової фільтрації та реабсорбції води), збільшенням секреції альдостерону та розладами іонорегуляторної функції нирок (зниження

натрійурезу, збільшенням екскреції калію з сечею). За цих умов використання метформіну покращувало функцію тубулярного та гломерулярного апаратів нирок (знижується поліурія, ретенційна азотемія, протеїнурія та зростає клубочкова фільтрація та реабсорбція води), зменшувало секрецію альдостерону та електролітні порушення. В літературі нами знайдено підтвердження того, що метформін за експериментального ЦД зменшував дисфункцію тубулярного та гломерулярного апаратів нирок, відновлював натрійурез (зменшував активність Na-Cl-котранспортера), а також зменшував секрецію альдостерону через зниження експресії в нирках рецепторів I типу до ангіотензину II [56, 57, 83].

Виникає питання щодо залученості системи  $H_2S$  в нирках до нефропротекторного потенціалу метформіну. Для цього спершу ми провели кореляційний аналіз і встановили, що у тварин, лікованих метформіном, між рівнем  $H_2S$  в нирках та показниками діурезу, рівня креатиніну в сироватці крові, протеїнурії, екскреції калію з сечею та сироватковим вмістом альдостерону виникали достовірні обернені асоціації ( $r = -(0,37-0,66)$ ,  $p < 0,05$ ), тоді як з кліренсом креатиніну, відносною реабсорбцією води, натрійурезом – вірогідні прямі зв'язки ( $r = 0,54-0,73$ ,  $p < 0,01$ ). Отримані результати надають додаткові докази причетності  $H_2S$  до нефропротекторної дії метформіну за ЦД. Тому, в подальшому ми оцінили внесок сигнальної системи  $H_2S$  в забезпечення ренопротективного потенціалу метформіну.

З'ясувалось, що використання донору  $H_2S$  – NaHS потенціювало коригуючий вплив метформіну на функціональний стан нирок, іонорегуляторну функцію нирок, тоді як введення інгібітору синтезу  $H_2S$  – ППГ вірогідно зменшував нефропротекторні властивості метформіну за СТЦ-діабету.

В групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» показник діурезу, сироватковий вміст креатиніну та екскреція білку 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 % ( $p < 0,01$ ), відносно

тварин, лікованих лише метформіном. Натомість у щурів, які отримували метформін в комбінації з ППГ показник діурезу, сироватковий вміст креатиніну та протеїнури 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, лікованими лише метформіном.

Модулювання обміну  $H_2S$  чинило різноспрямований вплив на іонорегуляторну функцію нирок та секрецію альдостерону. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін +  $NaHS$ » 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  $Na^+ / K^+$  сечі більші на 16,3 та 30,1 % ( $p < 0,05$ ) відносно 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  $Na^+ / K^+$  сечі менші на 16,9 та 24,6 % ( $p < 0,01$ ) ніж у тварин, лікованих метформін.

Проведені дослідження надали беззаперечні докази участі  $H_2S$  в механізмах захисної дії метформіну на нирки. Виникає питання щодо молекулярних механізмів через які реалізується вплив системи  $H_2S$  на функціонування нирок, участі в регуляції водно-електролітного обміну. За даними літератури  $NaHS$  через активацію  $K_{ATP}$ -каналів приносячих артеріол нирок посилює нирковий кровотік, збільшує швидкість клубочкової фільтрації та азотвидільну функцію нирок [117, 207, 216]. Поряд з цим донори  $H_2S$  стимулюють екскрецію натрію з сечею шляхом зниження активності  $Na-K-2Cl$ -котранспортеру,  $Na, K-ATP$ ази та  $Na$ -каналів, залежних від фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату [178, 216]. 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 входженню цинку в його активний центр; 3) інгібує зв'язування ангіотензину II з рецепторами I типу [70].

Результати проведеного дослідження засвідчили, що в механізмах нефропротекторної активності метформіну важливу роль відіграє  $H_2S$ -сигнальна система. Поряд з цим показано, що використання донорів  $H_2S$  асоціюється зі збільшенням захисного впливу метформіну на функціонування нирок за експериментального ЦД, що є перспективним для проведення подальших досліджень.

***Дослідження біохімічних маркерів фіброгенезу, апоптозу, запалення та оксидативного стресу в нирках щурів на тлі застосування метформіну та його комбінації з модуляторами обміну  $H_2S$  за СТЦ-діабету (розділ 4.2).***

Одноразове введення стрептозотоцину викликало вірогідне зростання в нирках рівнів маркеру фіброзу галектину-3 в 5,3 рази, проапоптотичного фактору каспази-3 в 5,6 рази та прозапального цитокіну  $IL-1\beta$  в 2,1 рази, відносно контролю. Поряд з цим за ЦД відмічалась індукція процесів ліпопероксидації та окисної деструкції протеїнів в нирках: вміст МДА та КГП були статистично достовірно більшими відповідно в 1,7 та 2 порівняно з контролем. За цих умов використання метформіну супроводжувалось зменшенням в нирках активності фіброгенезу (рівень галектину-3 знижувався на 48,4 %), апоптозу (рівень каспази-3 знижувався на 36,1 %) та запалення (рівень  $IL-1\beta$  знижувався на 25,3 %) відносно нелікованих тварин з СТЦ-діабетом. Також реєструвалось сповільнення вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів: вміст МДА та КГП були достовірно меншими відповідно на 27,4 та 24,7 відносно нелікованих тварин.

Проведені дослідження показали, що СТЦ-діабет супроводжувався рядом патохімічних порушень – розвитком оксидативного стресу, запалення, індукцією апоптозу та фіброгенезу, що знаходить своє підтвердження в літературі при проведенні подібних досліджень [56, 178]. За умов експериментального діабету застосування метформіну виявляло потужні антиоксидантну, протизапальну, антиапоптотичну та антифіброгенну дію, що



не суперечать даним літератури [56, 172, 223]. За результатами кореляційного аналізу встановлено, що на тлі лікування метформіном між вмістом  $H_2S$  в нирках та рівнем маркерів фіброзу, апоптозу, запалення, вільнорадикального окиснення ліпідів і протеїнів виникав достовірний обернений зв'язок ( $r = - (0,59-0,75)$ ,  $p < 0,001$ ). Отримані результати наводять на думку щодо причетності системи  $H_2S$  в нирках до механізмів реалізації нефропротекторних властивостей метформіну за ЦД. В той же час в 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  $H_2S$  в нирках [70, 178].

З метою отримання доказів можливої причетності системи  $H_2S$  до механізмів ренопротективної дії метформіну нами проведено дослідження впливу інгібітору синтезу  $H_2S$  - ППГ та донору  $H_2S$  – NaHS на протизапальну, антифіброгенну, антиапоптотичну 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. У групі тварин «СТЦ-діабет + Метформін + NaHS» рівні галектину-3, каспази-3 та IL-1 $\beta$  в нирках були вірогідно меншими відповідно на 36,6; 37,0 та 18,0 % ніж в групі тварин, які отримували лише метформін. За цих умов рівні МДА та КГП були достовірно меншими відповідно на 19,0 та 33,5 %, відносно тварин, які отримували лише метформін.

В той же час використання інгібітору синтезу  $H_2S$  чинило депримууючий вплив на вказані механізми нефропротекторної дії метформіну - вміст галектину-3, каспази-3 та IL-1 $\beta$  в нирках були вірогідно більшими відповідно на 41,6; 28,7 та 18,4 % ніж в групі тварин, які отримували лише метформін. Поряд з цим рівні МДА та КГП в нирках були достовірно більшими відповідно на 20,5 та 18,3 %, ніж у тварин, які отримували лише метформін.

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 фактору NF- $\kappa$ B, блокуванням мітоген-активованого протеїнкіназного (MAPK) сигналіngu, що веде до зниження продукції прозапальних цитокінів [84, 178]. Антифіброгенний потенціал гідроген сульфїду опосередковується через зниження активності ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, блокування сигнальних шляхів, залежних від MAPK та трансформуючого фактора росту (TGF- $\beta$ ), які стимулюють процеси ремоделювання сполучної тканини [116, 216]. Антиоксидантна дія донорів гідроген сульфїду супряжена з посиленням експресії ядерного фактору Nrf2, що веде до зростання активності антиоксидантного ензиму СОД та зниження активності прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази [112].

Проведенні дослідження засвідчили вагому роль системи H<sub>2</sub>S в реалізації протизапальної, антифіброгенної, антиапоптоїчної та антиоксидантної дії метформіну в нирках за ЦД. Поряд з цим отримані результати патогенетично обґрунтовують доцільність використання донорів H<sub>2</sub>S для потенціювання нефропротекторних властивостей метформіну.

***Гістологічні дослідження мікроскопічної структури нирок щурів на тлі застосування метформіну та його комбінації з модуляторами обміну H<sub>2</sub>S за СТЦ-діабету (розділ 5).***

При гістологічному дослідженні нирок щурів з СТЦ-діабетом виявляли виразні структурні зміни кіркового та мозкового шару нирок. Ниркові тільця відрізнялись один від одного особливостями гістоструктури: поряд з нечисельними нирковими тільцями, які за будовою подібні до таких у контрольної групи, виявляли ті, що мали зморщені клубочки, значно розширені сечові простори, в яких був розміщений білковий детрит, подекуди відмічали наявність гіпертрофованих ниркових тілець, навколо них виявляли виражену гістіолімфоцитарну інфільтрацію, гіпертрофію і гіперплазію

фіброblastів. Зовнішні стінки капсули клубочків були потовщені, просвіти їх капілярних судин розширені, повнокрівні, а в деяких спостерігали стаз, крайове стояння, адгезію та діapedез лейкоцитів, складжі еритроцитів і тромби. Ендотеліоцити стінок клубочкових капілярів мали ознаки набряку, їх ядра виступали в просвіт судин, базальна мембрана була потовщена, набрякла, відмічали наявність периваскулярних геморагій, гістіолімфоцитарної інфільтрації. Дистальні трубочки нефронів були розширені, їх стінки утворені епітеліоцитами мали меншу висоту, ніж у тварин групи контролю. В стінках деяких дистальних трубочок епітеліоцити були дистрофічно змінені, їх ядра темні, хроматин конденсований.

У щурів з СТЦ-діабетом, яким для корекції вводили метформін, патологічний процес охоплював всі структури в корі та мозковій речовині нирок, однак зміни були менш виражені, ніж у тварин без корекції. Більшість ниркових тілець за будовою подібні до таких у контрольної групи щурів. В деяких ниркових тільцях відмічали незначне розширення сечового простору, просвіти капілярів клубочка були розширені, однак повнокрів'я в них не виражене. Стінки більшої частини судин були суцільними, ендотеліоцити мали типову структуру. Поряд з цим реєструвалась незначна гіперплазія та гіпертрофія мезангіоцитів в деяких ниркових тільцях. В проксимальних звивистих і прямих трубочках нефронів більша частина епітеліоцитів мали світлу цитоплазму. подекуди виявляли проксимальні та дистальні трубочки в яких епітеліоцити мали ознаки зернистої дистрофії, однак їх кількість була значно меншою ніж у нелікованих тварин з СТЦ-діабетом.

У щурів з СТЦ-діабетом, яким на тлі дії стрептозотоцину вводили метформін в комбінації з пропаргілгліцином, структурні пошкодження в нирковій корі і мозковій речовині нирок були більш виражені, ніж у тварин, що отримували лише метформін. Судини кровоносного мікроциркуляторного русла в нирковій корі і мозковій речовині нирок були повнокрівними. Просвіти артеріол звужені, внутрішня еластична мембрана в них не однорідна, подекуди потовщена, розшарована. Ниркові тільця зі зморщеними та

гіпертрофованими клубочками і значно розширеними сечовими просторами, виявляли частіше, ніж у тварин, яким для корекції вводили лише метформін. Гістіолімфоцитарна інфільтрація, гіпертрофія та гіперплазія фібробластів навколо ниркових тілець були яскраво вираженими. Відмічали розширення просвітів капілярів клубочка, в їх стінках ендотеліоцити володіли ознаками гідропічної дистрофії, спостерігали явище так званих «голих ядер». Базальна мембрана капілярів клубочка була потовщена та набрякла. Гістіолімфоцитарна інфільтрація та набряк інтерстицію, а також гіперплазія мезангіоцитів навколо клубочкових капілярних судин були більш виразні, ніж у тварин, які отримували монотерапію метформіном. Просвіти деяких проксимальних та дистальних трубочок були розширені, містили десквамовані епітеліоцити та білковий детрит. В клітинах стінок проксимальних трубочок нефронів спостерігали вакуолярну та гіаліново-крапельну дистрофію цитоплазми.

При мікроскопічному дослідженні нирок щурів з СТЦ-діабетом, яким вводили метформін у поєднанні з донором гідроген сульфідом  $\text{NaHS}$ , структурні пошкодження нирок були найменш виразними серед усіх груп лікованих тварин. Артеріоли мали загальні закономірності будови, ділянок набряку, розшарування, плазматичного просякання стінок та набряку інтерстицію не виявлено. Переважна більшість ниркових тілець мали звичайну структуру, однак, траплялись поодинокі зморщені або гіпертрофовані тільця. Окремі капіляри клубочка характеризувались розширенням їх просвітів, що містили лейкоцити. Ендотеліальний шар стінок капілярів клубочка та їх базальна мембрана були суцільними. Навколо судин не виявляли геморагії, гістіолімфоцитарну інфільтрацію, набряку інтерстицію, а також гіперплазію мезангіоцитів. Стінки проксимальних і дистальних трубочок нефронів були цілісними, а ознаки десквамації епітеліоцитів виражені мінімально. Просвіти деяких проксимальних трубочок розширені, їх стінки утворені епітеліоцитами кубічної форми з добре забарвленими ядрами і світлою цитоплазмою. Гістіолімфоцитарна інфільтрація та інтерстиційний набряк навколо

перитубулярних судин був відсутнім, що, ймовірно, є проявом нормалізації судинної проникності.

Таким чином, за даними гістологічного дослідження стрептозотоцин-індукований діабет супроводжувався розвитком нефросклерозу та гіпертрофією клубочків, пошкодженням ендотелію судин, інтерстиційним запаленням та набряком, дистрофічними та некробіотичними змінами клубочків. За цих умов застосування метформіну виявляло нефропротекторну активність, яка характеризується зменшенням виразності нефросклерозу, гіпертрофії ниркових тілець, деструкції ендотелію, інтерстиційного запалення та пошкодження тубулярного апарату. Виявлені нами гістологічні зміни на тлі застосування метформіну не суперечать даним літератури при проведенні подібних досліджень [56, 114].

Використання модуляторів обміну гідроген сульфідом спричиняло різноспрямований вплив на ренопротективну активність метформіну у щурів з експериментальним цукровим діабетом. За даними гістологічних досліджень введення інгібітору синтезу гідроген сульфідом пропаргілгліцину зменшувало нефропротекторний потенціал метформіну – гістологічні зміни наближались до таких у щурів з нелікованим діабетом. В той же час, застосування донору гідроген сульфідом – NaHS потенціювало захисну дію метформіну щодо нирок.

На основі проведених досліджень та даних літератури нами створено узагальнюючу схему молекулярних механізмів нефропротекторної активності метформіну за діабетичної нефропатії та молекулярні мішені дії донору гідроген сульфідом NaHS (рис. 6.1).

За цукрового діабету метформін виявляє потужні нефропротекторні властивості, які включають антифіброгенну, протизапальну, антиапоптотичну, антиоксидантну дії, тубуло- та гломерулопротекторний ефект, а також депримує вплив на активність РААС.

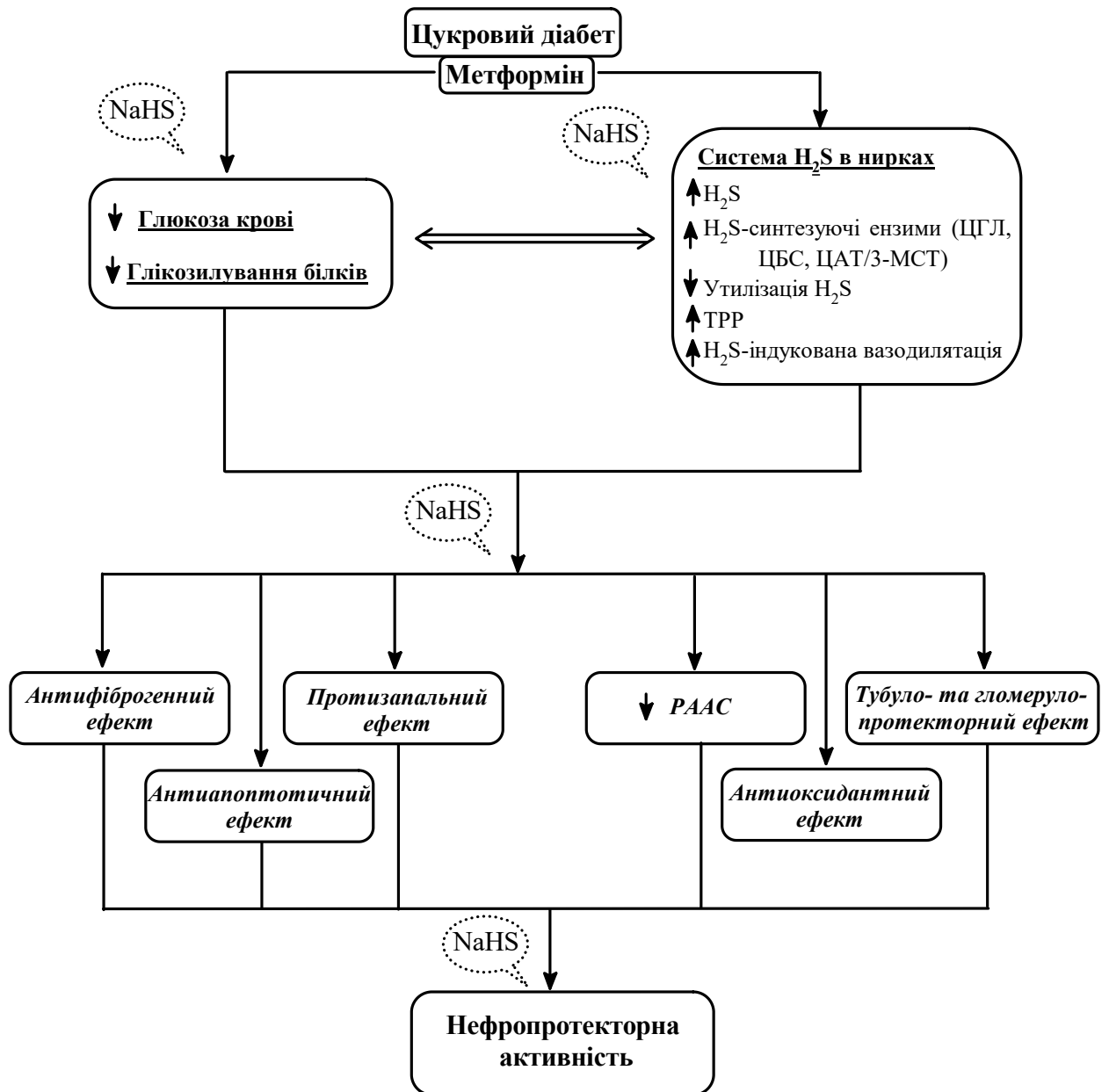


Рис. 6.1 Роль гідроген сульфїду в механїзмах нефропротекторної дїї метформїну за цукрового діабету. Молекулярні мїшені дїї донору гїдроген сульфїду

Захисна дїя метформїну на нирки за цукрового діабету асоцїюється з його гіпоглікемічною активністю та впливом на систему H<sub>2</sub>S в нирках (зростають запаси H<sub>2</sub>S, активність H<sub>2</sub>S-синтезуючих ензимів, зменшується швидкість утилізації H<sub>2</sub>S та збільшується швидкість його депонування у складі персульфїдів). Вплив метформїну на систему H<sub>2</sub>S до певної мїри асоцїюється з його гіпоглікемічною активністю, що було показано в нашій роботі. Однак,

не виключено, що метформін має безпосередній вплив на  $H_2S$ -сигналінг в нирках, адже в літературі існують дані, що він стимулює експресію основного  $H_2S$ -синтезуючого ферменту ЦГЛ за експериментального діабету, а також у інтактних тварин збільшує рівень  $H_2S$  в різних органах, в тому числі й нирках.

Використання донору гідроген сульфїду NaHS потенціює нефропротекторні властивості метформїну, що пов'язано з його здатністю збільшувати запаси  $H_2S$  в нирках та посилювати гіпоглікемічну активність метформїну.

### **Резюме до розділу 6.**

Результати проведених біохімічних, імуноферментних, електрофізіологічних та гістологічних досліджень експериментально обґрунтовують можливість та необхідність використання донорів  $H_2S$  з метою оптимізації фармакотерапії діабетичної нефропатії гіпоглікемічним засобом метформїном.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення актуального наукового завдання сучасної медицини, що полягало в експериментальному обґрунтуванні нових підходів до фармакокорекції діабетичної нефропатії на основі дослідження ролі гідроген сульфїду ( $H_2S$ ) в молекулярних механїзмах нефропротекторної дії метформїну.

1. Застосування метформїну за експериментального цукрового діабету супроводжувалось зменшенням дефіциту  $H_2S$  в нирках (рівень  $H_2S$  зростав на 27,9 % порівняно з нелікованими тваринами,  $p < 0,001$ ), збільшенням активності  $H_2S$ -синтезуючих ферментів (на 18,6-60,0 %,  $p < 0,001$ ), активності тіоредоксинредуктази (на 15,2 %,  $p < 0,05$ ), зменшенням швидкості утилізації  $H_2S$  (на 32,7 %,  $p < 0,001$ ), збільшенням чутливості ниркових артерій до вазодилатуючої дії  $H_2S$  (показник  $EC_{50}$  ( $H_2S$ ) зменшувався на 22,8 %,  $p < 0,01$ ), що тісно асоціювалось ( $|r| = 0,60-0,80$ ,  $p < 0,01$ ) з його гіпоглікемічною активністю (рівень глюкози зменшувався на 25,2 %,  $p < 0,001$ ). Введення донору  $H_2S$  натрій гїдрогенсульфїду ( $NaHS$ ) потенціювало гіпоглікемічну активність метформїну, здатність коригувати обмін  $H_2S$  в нирках та чутливість ниркових артерій до вазодилатуючої дії  $H_2S$ , тоді як використання інгїбітору синтезу  $H_2S$  пропаргїлгліцину виявляло протилежний ефект.

2. Використання метформїну на тлі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету викликало зменшення гломерулярних та тубулярних порушень (збільшувався кліренс креатинїну на 13,1 %,  $p < 0,05$ , знижувалась протеїнурія на 25,1 %,  $p < 0,001$ , вірогідно зростав відносний показник реабсорбція води), зниження секреції альдостерону (на 18,1 %,  $p < 0,001$ ) та збільшення натрійурезу (на 18,6 %,  $p < 0,05$ ), що корелювало зі збільшенням рівня  $H_2S$  в



нирках ( $|r| = 0,37-0,73$ ,  $p < 0,01$ ). 27,9 %,  $p < 0,001$ ). Введення модуляторів обміну  $H_2S$  модифікувало ренопротективну дію метформіну за цукрового діабету: NaHS посилював 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 пропаргілгліцин зменшував нефропротекторну активність метформіну.

3. За експериментального цукрового діабету введення метформіну виявляло антиоксидантний (рівень малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів зменшувався на 24,7-27,4 %,  $p < 0,001$ ), протизапальний (рівень  $IL-1\beta$  знижувався на 25,3 %,  $p < 0,001$ ), антиапоптотичний (рівень каспази-3 знижувався на 36,1 %,  $p < 0,001$ ) та антисклеротичний ефекти (рівень галектину-3 знижувався на 48,4 %,  $p < 0,001$ ) в нирках, що асоціювалось зі збільшенням рівня  $H_2S$  ( $|r| = 0,59-0,75$ ,  $p < 0,01$ ). NaHS потенціював захисну дію метформіну на нирки (рівні галектину-3, каспази-3,  $IL-1\beta$ , малонового діальдегіду та карбонільних груп протеїнів у нирках були вірогідно меншими відповідно на 18-37 %,  $p < 0,001$ , ніж у тварин, які отримували лише метформін), тоді як пропаргілгліцин виявляв протилежний ефект.

4. Застосування метформіну зменшувало ініційовані цукровим діабетом ультраструктурні зміни в нирках - нефросклероз, гіпертрофію клубочків, деструкцію ендотеліоцитів судин, запалення, дистрофію епітеліоцитів проксимальних каналців нефрона. Введення метформіну в комбінації з NaHS більш ефективно ніж монотерапія коригувало пошкодження каналцевого та клубочкового апаратів нирок. В той же час за умов поєднання метформіну та пропаргілгліцину ультраструктурні зміни в нирках наближались до таких у нелікованих тварин з цукровим діабетом.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Власенко, М. В., Кучевська, Н. В., Кривов'яз, Ю. О., & Секрет, Т. В. (2016). Метформін у лікуванні цукрового діабету 2-го типу: у фокусі уваги - клінічні аспекти. *Практикуючий лікар*, 3(5), 26-30. <https://plr.com.ua/index.php/journal/article/view/151>
2. Дідушко, О.М. (2020). Цукровий діабет 2-го типу і хронічна хвороба нирок: сучасні можливості цукрознижувальної терапії. *Міжнародний ендокринологічний журнал*, 16(3), 251–256. doi: <http://dx.doi.org/10.22141/2224-0721.16.3.2020.205275>
3. Заїчко, Н. В., Ольховський, О. С., Юрченко, П. О., Мельник, А. В., & Штатко, О. І. (2014). *Спосіб визначення утилізації H<sub>2</sub>S в органах тварин* (Патент України на корисну модель № 87884). Державна служба інтелектуальної власності України. <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=197439>
4. Заїчко, Н.В, Паламарчук, І.В., Струтинська, О.Б., & Штатко, О.І. (2017). Вплив антидіабетичних засобів на систему цистатіонін-гама-ліази/гідроген сульфід у міокарді та нирках щурів. *Матеріали V Національного з'їзду фармакологів України, м. Запоріжжя, 18-20 жовтня 2017 р. (с. 46)*. <https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/2745?show=full&localeattribute=uk>
5. Заїчко, Н.В., Паламарчук, І.В., & Струтинська, О.Б. (2017). Вплив антидіабетичних засобів на вміст гідроген сульфід та активність H<sub>2</sub>S-синтезуючих ензимів в органах щурів із стрептозотоциновим діабетом. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ): матеріали LX науково-практичної конференції, м.*

Тернопіль, 14 червня 2017 р. (с. 290–292). ТДМУ «Укрмедкнига».  
<https://repository.tdmu.edu.ua/handle/1/8519>

6. Заїчко, Н.В., Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В. (2016). *Застосування натрієвої солі гідрогену сульфїду для потенціювання вазопротективного ефекту антидіабетичних засобів* (Патент України №107767). Державна служба інтелектуальної власності України.  
<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=24555>
7. Заїчко, Н.В., Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В. (2016). *Застосування натрієвої солі гідрогену сульфїду для потенціювання антидіабетичної дії метформїну* (Патент України №107765). Державна служба інтелектуальної власності України.  
<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=24553>
8. Мельник, А. В. &, Пентюк, О. О. (2009) Активність ензимів синтезу гідроген сульфїду в нирках щурів. *Укр. біохім. журнал*, 81(4), 12-22.  
<http://ubj.biochemistry.org.ua/index.php/journalarchiveac/2009ad/qq4/2608>
9. Паламарчук, І.В., Струтинська, О.Б, Мельник., А.В., & Заїчко, Н.В. (2020) Вплив метформїну та його поєднання з натрій гідрогенсульфїдом на стан системи H<sub>2</sub>S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках щурів за стрептозотоцин-індукованого діабету. *Вісник проблем біології і медицини*, 157(3), 133-137. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137>.
10. Паньків, В.І. (2020). Цукровий діабет 2-го типу: сучасні міжнародні настанови, персоніфікований підхід і реальна амбулаторна практика. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 16(6). 463–470. doi: 10.22141/2224-0721.16.6.2020.215384
11. Струтинська, О.Б. (2016). Роль системи гідроген сульфїду в розвитку діабетичної нефропатії у щурів. *Матеріали 85-ої науково-практичної конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю*

«Інновації в медицині», м Івано-Франківськ, 24 – 25 березня 2016 р. (с. 257-258). ДВНЗ «Івано-франківський національний медичний університет». <https://www.ifnmu.edu.ua/uk/snt/85-naukovo-praktychna-konferentsiia-studentiv-i-molodykh-vchenykh>

12. Струтинська, О.Б. (2019). Стан систему гідроген сульфід у нирках щурів за експериментального цукрового діабету. *Перший крок в науку – 2019: матеріали XVI міжнародної конференції студентів та молодих вчених, м. Вінниця, 18-19 квітня 2019 р. (с. 467). ВНМУ. [https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/4436466 – 467](https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/4436466-467)*
13. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2022). Вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфід на рівень глікемії і стан системи H<sub>2</sub>S у нирках щурів при стрептозотоциніндукованому діабеті. *Медична та клінічна хімія*, 24(4), 5-12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2022.i4.13565>.
14. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2022). Роль модуляторів обміну гідроген сульфід у модифікації нефропротекторної дії метформіну за стрептозотоцин-індукованого діабету. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 16(6), 387-396. <https://doi.org/10.33250/16.06.387>.
15. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Морфологічні зміни тканин нирок щурів за експериментального цукрового діабету і на тлі корекції метформіном і модуляторами обміну гідроген сульфід. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 27(1), 10-16. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-02](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-02)
16. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Роль системи гідроген сульфід у механізмах нефропротекторної дії метформіну за стрептозотоциніндукованого діабету. *Вісник медичних і біологічних досліджень*, 15(1), 15-21. <https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13352>.
17. Струтинська, О.Б., Мельник, А.В., & Штатко О.І., (2019). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфід на функціональний стан нирок

- щурів за експериментального цукрового діабету. *Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. (с. 240-241)*. Медична та клінічна хімія, 21(3, додаток). ТДМУ «Укрмедкнига». <http://www.biochemistry.org.ua/index.php/uk/ubs-society-newsua/5590-11-10-2019-30-04-2019>
18. Струтинська, О.Б., Мельник, А.В., Заїчко, Н.В., & Слободянюк, В.А. (2019). Стан H<sub>2</sub>S-індукованої вазодилатації ниркових артерій за експериментальної діабетичної нефропатії у щурів. *Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка, Київ, 27-30 травня 2019 р. (с. 33)*. Фізіологічний журнал, 65(3). [https://fz.kiev.ua/journals/2019\\_V.65/2019-3sup/3-supplement\\_%202019.pdf](https://fz.kiev.ua/journals/2019_V.65/2019-3sup/3-supplement_%202019.pdf)
19. Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В., & Заїчко, Н.В. (2016). Вплив гідроген сульфід у антидіабетичний ефект метформіну за стрептозотоцинового діабету у щурів. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні», м. Вінниця, 24 лютого 2016 р. (с. 91 – 93)*. ВНМУ.
20. Ткаченко, М.М., Сагач, В.Ф., Базілюк, О.В. (2005). Вікові особливості змін скорочувальних судинних реакцій і вміст вільних радикалів кисню та метаболітів оксиду азоту у мишей лінії BALB/c за умов перебування у зоні відчуження. *Фізіолог. журн.*, 51(3). 32-41. [https://fz.kiev.ua/journals/2005\\_V.51/Fiziologichni%20Zhurnal%2051\(3\)\\_2005/Fiziologichni%20Zhurnal%2051\(3\)\\_2005\\_32-41.pdf](https://fz.kiev.ua/journals/2005_V.51/Fiziologichni%20Zhurnal%2051(3)_2005/Fiziologichni%20Zhurnal%2051(3)_2005_32-41.pdf)
21. Царик, І.О., & Пашковська, Н.В. (2020). Фенотип діабетичної хвороби нирок (огляд літератури та власні дані). *Міжнародний ендокринологічний журнал*, 16(3), 265–271. doi: <http://dx.doi.org/10.22141/2224-0721.16.3.2020.205277>
22. Шевчук, С. В., Пентюк, О. О., Мусін, Р. А., Заїчко, Н. В. (2003). *Способ*

визначення карбонільних сполук в сироватці крові (Патент України на корисну модель № 58110А). Міністерство освіти і науки України. Державний департамент інтелектуальної власності.  
<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=75674>

23. Abou-Hamdan, A. (2015). Oxidation of H<sub>2</sub>S in mammalian cells and mitochondria. *Methods Enzymol.*, 554, 201–228. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.042.
24. Abu-Alfa, A.K., Atallah, P.J., Azar, S.T., Dagher, E.C., Echtay, A.S., El-Amm, M.A., ... Mohamad, M.A. (2023). Recommendations for Early and Comprehensive Management of Type 2 Diabetes and Its Related Cardio-Renal Complications. Lebanese Consortium for Early, Comprehensive Management of Type 2 Diabetes (LCECMD). *Diabetes Ther.*, 14(1), 11-28. doi: 10.1007/s13300-022-01340-x.
25. Aghadavod, E., Khodadadi, S., Baradaran, A., Nasri, P., Bahmani, M., & Rafieian-Kopaei M. (2016). Role of oxidative stress and inflammatory factors in diabetic kidney disease. *Iran J Kidney Dis.*, 10(6), 337–343.
26. Ahmad, A.A., Draves, S.O., & Rosca, M. (2021). Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. *Cells.*, 10(11). doi: 10.3390/cells10112945.
27. Ahmed, H.H., Taha, F.M., Omar, H.S., Elwi, H.M., & Abdelnasser M. (2019). Hydrogen sulfide modulates SIRT1 and suppresses oxidative stress in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biochem.*, 457(1-2), 1-9. doi: 10.1007/s11010-019-03506-x.
28. Alicic, R.Z., Rooney, M.T., & Tuttle, K.R. (2017). Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol.*, 12(12), 2032-2045. doi: 10.2215/CJN.11491116.
29. Al-Magableh, M.R., Kemp-Harper, B.K., & Hart J.L. (2015). Hydrogen sulfide treatment reduces blood pressure and oxidative stress in angiotensin II-induced hypertensive mice. *Hypertens. Res.*, 38:13–20. doi: 10.1038/hr.2014.125.

30. Altaany, Z., Yang, G., & Wang, R. (2013). Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 17, 879–888. doi: 10.1111/jcmm.12077.
31. Amorim, R.G., Guedes, G.D.S., Vasconcelos, S.M.L., & Santos, J.C.F. (2019). Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation. *Arq Bras Cardiol*, 112(5), 577-587. doi: 10.5935/abc.20190077.
32. Anders, H.J., Huber, T.B., Isermann B., & Schiffer M. (2018). CKD in diabetes: Diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 14, 361–377. doi: 10.1038/s41581-018-0001-y.
33. Anders, H-J. (2016). Of inflammasomes and alarmins: IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.*, 27(9), 2564–2575. doi: 10.1681/ASN.2016020177.
34. Arsov, S., Graaff, R., Van Oeveren, W., Stegmayr, B., Sikole, A., Rakhorst, G., & Smit, A.J. (2014). Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med.*, 52(1), 11–20. DOI: 10.1515/cclm-2012-0832
35. 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.
36. Banerjee, R. (2017). Catalytic promiscuity and heme-dependent redox regulation of H<sub>2</sub>S synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology.*, 37, 115–121. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.02.021.
37. Beck, K. F., & Pfeilschifter, J. (2022). The Pathophysiology of H<sub>2</sub>S in Renal Glomerular Diseases. *Biomolecules*, 12(2). doi: 10.3390/biom12020207.
38. Beckerman, P., & Susztak K. (2014). Sweet debate: fructose versus glucose in diabetic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(11), 2386–2388. doi: 10.1681/asn.2014050433.
39. Beltowski, 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.
40. Blacker, T.S., & Duchon, M.R. (2016). Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic Biol Med.*, 100, 53–65.
  41. Boddepalli, C.S., Gutlapalli, S.D., Lavu, V.K., Abdelwahab Mohamed Abdelwahab, R., Huang, R., Potla, S., ... Khan, S. (2022). The Effectiveness and Safety of Metformin Compared to Sulfonylureas in Diabetic Nephropathy: A Systematic Review. *Cureus.*, 14(12). doi: 10.7759/cureus.32286.
  42. Bonner, R., Albajrami, O., Hudspeth, J., Upadhyay, A. (2020). Diabetic Kidney Disease. *Prim Care. Dec*, 47(4), 645-659. doi: 10.1016/j.pop.2020.08.004.
  43. Bos, E. M., Wang, R., Snijder, P. M., Boersema, M., Damman, J., Fu, M., ... van Goor, H. (2013). Cystathionine  $\gamma$ -lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 24, 759–770. doi: 10.1681/ASN.2012030268.
  44. Bose, M., Almas, S., & Prabhakar S. (2017). Wnt signaling and podocyte dysfunction in diabetic nephropathy. *J Investig Med.*, 65(8), 1093–1101. doi: 10.1136/jim-2017-000456.
  45. Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Zaid, A., Giannogonas, P., ... Wang, R. (2012). cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0053319.
  46. Cao, X., & Bian, J.S. (2016). The Role of Hydrogen Sulfide in Renal System. *Front Pharmacol*. doi: 10.3389/fphar.2016.00385.
  47. Castro, E. (2011). The role of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. *Arq Med.*, 25(1), 27–37.
  48. Cha, J.J., Min, H.S., Kim, K.T., Kim, J.E., Ghee, J.Y., Kim, H.W., ... Ha, H.J. (2017). APX-115, a first-in-class pan-NADPH oxidase (Nox) inhibitor,



- protects db/db mice from renal injury. *Lab. Investig.*, 97, 419–431. doi: 10.1038/labinvest.2017.2.
49. 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  $\gamma$ -lyase/hydrogen sulfide activity and via a RhoA/ROCK1 pathway. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 27(2). doi: 10.31083/j.fbl2702049.
  50. Charytan, D. M.; Solomon, S. D.; Ivanovich, P.; Remuzzi, G.; Cooper, M. E.; McGill, J. B. ... Pfeffer M. A. (2019). Metformin use and cardiovascular events in patients with type 2 Diabetes and chronic kidney disease. *Diabetes Obes. Metab.* 2019, 21, 1199–1208. doi: 10.1111/dom.13642.
  51. Chen, J, Chen, JK, & Harris, RC. (2015). EGF receptor deletion in podocytes attenuates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.*, 26(5), 1115–1125. doi: 10.1681/ASN.2014020192.
  52. Chen, X., Xiao, L., Yu, S., Ren, Z., Wang, W., Jia, Y., ... Wang, X.(2023). GYY4137, a H2S donor, ameliorates kidney injuries in diabetic mice by modifying renal ROS-associated enzymes. *Biomed Pharmacother.* doi: 10.1016/j.biopha.2023.114694.
  53. Christensen, M., Norgard, M.O., Jensen, M.S., Moller, B.K., & Norregaard, R. (2019). Metformin modulates immune cell infiltration into the kidney during unilateral ureteral obstruction in mice. *Physiol. Rep.* doi: 10.14814/phy2.14141.
  54. Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., ... Martin, E. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109, 9161–9166. doi: 10.1073/pnas.1202916109.
  55. Dai, H., Liu, Q., & Liu, B. (2017). Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res.* doi: 10.1155/2017/2615286.

56. Dawood, A. F., Maarouf, A., Alzamil, N. M., Momenah, M. A., Shati, A. A., Bayoumy, N. M. ... Al-Ani, B. (2022). 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*, 10(7). doi: 10.3390/biomedicines10071644.
57. Deshmukh A, & Manjalkar P. (2021). Synergistic effect of micronutrients and metformin in alleviating diabetic nephropathy and cardiovascular Dysfunctioning in diabetic rat. *J Diabetes Metab Disord*, 20(1):533-541. doi: 10.1007/s40200-021-00776-5.
58. 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.
59. Donate-Correa J., Martín-Núñez, E., Muros-de-Fuentes, M., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J.F. (2015). Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Diabetes Res*. doi: 10.1155/2015/948417.
60. Dounousi, E., Duni, A., Leivaditis, K., Vaios, V., Eleftheriadis, T., & Liakopoulos, V. (2015). Improvements in the Management of Diabetic Nephropathy. *Rev. Diabet. Stud*, 12, 119–133. doi: 10.1900/RDS.2015.12.119.
61. Du, C. (2019). Sulfhydrated sirtuin-1 increasing its deacetylation activity is an essential epigenetics mechanism of anti-atherogenesis by hydrogen sulfide. *Antioxidants Redox Signal.*; 30, 184–197. doi: 10.1089/ars.2017.7195.
62. 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  $\alpha$ -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.

63. Elbassuoni, E.A., Aziz, N.M., & Habeeb, W.N. (2020). The role of activation of KATP channels on hydrogen sulfide induced renoprotective effect on diabetic nephropathy. *J Cell Physiol.*, 235(6), 5223-5228. doi: 10.1002/jcp.29403.
64. Elsherbiny, N.M., & Al-Gayyar, M.M.H. (2016). The role of IL-18 in type 1 diabetic nephropathy: the problem and future treatment. *Cytokine*, 81, 15–22. doi: 10.1016/j.cyto.2016.01.014.
65. Erekat, N., Rababa'h, R., & Al-Jarrah, M. (2019). Overexpression of renal proapoptotic factors is attenuated subsequent to endurance exercise in Type I diabetes: An immunohistochemistry study. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 10(1), 24-28. DOI:10.4103/jnsbm.JNSBM\_60\_18
66. Erekat, N.S. (2022). Programmed Cell Death in Diabetic Nephropathy: A Review of Apoptosis, Autophagy, and Necroptosis. *Med Sci Monit.* doi: 10.12659/MSM.937766.
67. Fantus, D., Rogers, N.M., Grahammer, F., Huber, T.B., & Thomson, A.W. (2016). Roles of mTOR complexes in the kidney: Implications for renal disease and transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.*, 12, 587–609. doi: 10.1038/nrneph.2016.108.
68. Feigerlová, E., & Battaglia-Hsu, S.F. (2017). IL-6 signaling in diabetic nephropathy: From pathophysiology to therapeutic perspectives. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 37, 57–65. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.03.003.
69. Feliers, D., Lee, H.J., & Kasinath, B.S. (2016). Hydrogen Sulfide in Renal Physiology and Disease. *Antioxid Redox Signal.*, 25(13), 720-731. doi: 10.1089/ars.2015.6596.
70. 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.
71. Feng, Y., Wang, S., Zhang, Y., & Xiao, H. (2017). Metformin attenuates renal fibrosis in both AMPKalpha2-dependent and independent manners. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 44, 648–655. doi: 10.1111/1440-1681.12748.

72. Friederich, M.W. (2020). Pathogenic variants in SQOR encoding sulfide:quinone oxidoreductase are a potentially treatable cause of Leigh disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* doi: 10.1002/jimd.12232.
73. Fujita, T., Ogihara, N., Kamura, Y., Satomura, A., Fuke, Y., & Shimizu, C. (2012). Interleukin-18 contributes more closely to the progression of diabetic nephropathy than other diabetic complications. *Acta Diabetol.*, 49(2), 111–117. doi: 10.1007/s00592-010-0178-4.
74. Furuhashi, M. (2020). New insights into purine metabolism in metabolic diseases: Role of xanthine oxidoreductase activity. *Am. J. Physiol. Metab.*, 319, 827–834. doi: 10.1152/ajpendo.00378.2020.
75. García-García, P.M., Getino-Melián, M.A., Domínguez-Pimentel, V., & Navarro-González, J.F. (2014). Inflammation in diabetic kidney disease. *World J Diabetes.*, 5(4), 431–443. doi: 10.4239/wjd.v5.i4.431.
76. Ge, S.N., Zhao, M.M., Wu, D.D., Chen, Y., Wang, Y., Zhu, J.H., ... Zhu, Y.C. (2014). Hydrogen sulfide targets EGFR Cys797/Cys798 residues to induce Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase endocytosis and inhibition in renal tubular epithelial cells and increase sodium excretion in chronic salt-loaded rats. *Antioxid. Redox Signal.*, 21, 2061–2082. doi: 10.1089/ars.2013.5304.
77. Geraldès, P., & King, L.G. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res.*, 106(8), 1319–1331. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092150
78. 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.
79. Giuffrè, A., & Vicente, J.B. (2018). Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxid Med Cell Longev.* doi: 10.1155/2018/6290931.
80. Guan, Z., VanBeusecum, J.P., & Inscho E.W. (2015). Endothelin and the renal microcirculation. *Semin. Nephrol.*, 35, 145–155. doi: 10.1016/j.semnephrol.2015.02.004.

81. Guo Q., Feng X., Xue H., Teng X., Jin S., Duan X., ... Wu Y. (2017). Maternal renovascular hypertensive rats treatment with hydrogen sulfide increased the methylation of AT1b gene in offspring. *Am. J. Hypertens.*, 30, 1220–1227. doi: 10.1093/ajh/hpx124.
82. Han, Q., Zhu, H., Chen, X., & Liu Z. (2017). Non-genetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Front. Med.*, 11, 319–332. doi: 10.1007/s11684-017-0569-9.
83. Hashimoto, H.; Nomura, N.; Shoda, W.; Isobe, K.; Kikuchi, H.; Yamamoto, K. ... Sohara E. (2018). Metformin increases urinary sodium excretion by reducing phosphorylation of the sodium-chloride cotransporter. *Metabolism*, 85, 23–31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.02.009>.
84. 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.
85. Holman, R. R.; Paul, S. K.; Bethel, M. A.; Matthews, D. R.; & Neil, H. A. (2008). 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 359, 1577–1589. doi: 10.1056/NEJMoa0806470
86. Hong, Q., Cai, H., Zhang, L., Li, Z., Zhong, F., Ni, Z., Cai, G., Chen, X.M., He, J.C., & Lee, K. (2022). Modulation of transforming growth factor-beta-induced kidney fibrosis by leucine-rich-2 glycoprotein-1. *Kidney Int.*, 101, 299–314. doi: 10.1016/j.kint.2021.10.023.
87. Hou, B.Y., Qiang, G.F., Zhao, Y.R., Yang, X.Y., Chen, X., Yan, Y., ... Du, G.H. (2017). Salvianolic Acid A Protects Against Diabetic Nephropathy through Ameliorating Glomerular Endothelial Dysfunction via Inhibiting AGE-RAGE Signaling. *Cell. Physiol. Biochem.*, 44, 2378–2394. <https://doi.org/10.1159/000486154>

88. Hsu, C.N., & Tain, Y.L. (2018). Hydrogen Sulfide in Hypertension and Kidney Disease of Developmental Origins. *Int J Mol Sci.*, 19(5). doi: 10.3390/ijms19051438.
89. Hu, C., Sun, L., Xiao, L., Han, Y., Fu, X., Xiong, X., ... Liu, F. (2015). Insights into the mechanisms involved in the expression and regulation of extracellular matrix proteins in diabetic nephropathy. *Curr. Med. Chem.*, 22, 2858–2870. doi: 10.2174/0929867322666150625095407.
90. Huang, Y., Zhang, Z., Huang, Y., Mao, Z., Yang, X., Nakamura, Y., ... Yao, J. (2018). Induction of inactive TGF-beta1 monomer formation by hydrogen sulfide contributes to its suppressive effects on Ang II- and TGF-beta1-induced EMT in renal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 501, 534–540. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.032.
91. Hung, P.H., Hsu, Y.C., Chen, T.H., & Lin, C.L. (2021). Recent Advances in Diabetic Kidney Diseases: From Kidney Injury to Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci*, 22(21). doi: 10.3390/ijms222111857.
92. 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.
93. Ishibashi, Y., Matsui, T., Takeuchi, M., & Yamagishi, S. (2012). Beneficial effects of metformin and irbesartan on advanced glycation end products (AGEs)-RAGE-induced proximal tubular cell injury. *Pharm. Res.*, 65, 297–302. doi: 10.1016/j.phrs.2011.11.001.
94. Jain, S.K., Bull, R., Rains, J.L., Bass, P.F., Levine, S.N., Reddy, S., ... Bocchini, J.A. (2010). Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxid. Redox Signal.*, 12, 1333–1337. doi: 10.1089/ars.2009.2956.
95. Jha, J.C, Banal, C, Chow, B.S.M, Cooper, M.E, & Jandeleit-Dahm, K. (2016). Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.*, 25(12), 657-684. doi: 10.1089/ars.2016.6664

96. Jha, J.C., Dai, A., Garzarella, J., Charlton, A., Uner, S., Ostergaard, J.A., ... Power, D.A. (2022). Independent of Renox, NOX5 Promotes Renal Inflammation and Fibrosis in Diabetes by Activating ROS-Sensitive Pathways. *Diabetes*, 71, 1282–1298. <https://doi.org/10.2337/db21-1079>
97. Jin, Q, & Ma, R.C.W. (2021). Metabolomics in Diabetes and Diabetic Complications: Insights from Epidemiological Studies. *Cells*. 10(11). doi: 10.3390/cells10112832.
98. Jung, C.Y., & Yoo, T.H. (2022). Pathophysiologic Mechanisms and Potential Biomarkers in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes Metab J.*, 46(2), 181-197. doi: 10.4093/dmj.2021.0329.
99. 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
100. Jung, S.W., & Moon, J.Y. (2021). The role of inflammation in diabetic kidney disease. *Korean J Intern Med*, 36(4):753-766. doi: 10.3904/kjim.2021.174.
101. Kabil, O.R. (2014). Enzymology of H<sub>2</sub>S biogenesis, decay and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling.*, 20(5), 770–782. doi: 10.1089/ars.2013.5339.
102. 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.
103. Khunti, K., de Boer, I.H., Rossing, P. (2021). Chronic Kidney Disease in Diabetes: Guidelines from KDIGO. *Am Fam Physician*, 103(11), 698-700.
104. Kida, M., Sugiyama, T., Yoshimoto, T., & Ogawa, Y. (2013). Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 48, 211–215. doi: 10.1016/j.ejps.2012.11.001.
105. Kohan, D.E., & Barton, M. (2014). Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int.*, 86, 896–904. doi: 10.1038/ki.2014.143.

106. Koike, S., Ogasawara, Y., Shibuya, N., Kimura, H., & Ishii, K. (2013). Polysulfide Exerts a Protective Effect against Cytotoxicity Caused by T-Buthylhydroperoxide through Nrf2 Signaling in Neuroblastoma Cells. *FEBS Lett.*, 587, 3548–3555. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.013.
107. Kundu, S., Pushpakumar, S., Khundmiri, S. J., & Sen, U. (2014). Hydrogen sulfide mitigates hyperglycemic remodeling via liver kinase B1-adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1843(12), 2816-2826. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.08.005.
108. Kwon, S.; Kim, Y. C.; Park, J. Y.; Lee, J.; An, J. N.; Kim, C. T. ... Lee J. P. (2020). The long-term effects of metformin on patients with type 2 diabetic kidney disease. *Diabetes Care*, 43, 948–955. <https://doi.org/10.2337/dc19-0936>
109. Lalau, J. D.; Kajbaf, F.; Bennis, Y.; Hurtel-Lemaire, A. S.; Belpaire, F.; & De Broe, M. E. (2018). Metformin treatment in patients with type 2 Diabetes and chronic kidney disease stages 3A, 3B, or 4. *Diabetes Care*, 41, 547–553. <https://doi.org/10.2337/dc17-2231>.
110. Lanaspá, M. A., Ishimoto, T., & Cicerchi C. (2014). Endogenous fructose production and fructokinase activation mediate renal injury in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology.*, 25(11), 2526–2538. doi: 10.1681/ASN.2013080901.
111. Lassén, E., & Daehn, I.S. (2020). Molecular Mechanisms in Early Diabetic Kidney Disease: Glomerular Endothelial Cell Dysfunction. *Int J Mol Sci*, 21(24). doi: 10.3390/ijms21249456.
112. Lee, H. J., Lee, D. Y., Mariappan, M. M., Feliers, D., Ghosh-Choudhury, G., Abboud, H. E. ... Kasinath, B. S. (2017). 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*, 292(14), 5665-5675. doi: 10.1074/jbc.M116.766758.
113. Lee, H.J., Mariappan, M.M., Feliers, D., Cavaglieri, R.C., Sataranatarajan, K., Abboud, H.E., ... Kasinath, B.S. (2012). Hydrogen sulfide inhibits high



- glucose-induced matrix protein synthesis by activating AMP-activated protein kinase in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 287, 4451–4461. doi: 10.1074/jbc.M111.278325.
114. Lehtonen S. (2020). Metformin Protects against Podocyte Injury in Diabetic Kidney Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*. 13(12). doi: 10.3390/ph13120452.
  115. Li, H., Feng, S.J., Zhang, G.Z., & Wang, S.X. (2014). Correlation of lower concentrations of hydrogen sulfide with atherosclerosis in chronic hemodialysis patients with diabetic nephropathy. *Blood Purif.*, 38, 188–194. doi: 10.1159/000368883.
  116. 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.
  117. Li, Z.; Organ, C. L.; Kang, J.; Polhemus, D. J.; Trivedi, R. K.; Sharp, T. E. ... Lefler, D. J. (2018). Hydrogen sulfide attenuates renin angiotensin and aldosterone pathological signaling to preserve kidney function and improve exercise tolerance in heart failure. *JACC Basic Transl*, 3, 796–809. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.08.011>
  118. Lin, Y.C., Chang, Y.H., Yang, S.Y., Wu, K.D., & Chu, T.S. (2018). Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J. Formos. Med. Assoc.*, 117, 662–675. doi: 10.1016/j.jfma.2018.02.007.
  119. Liu, L, Huang, S, & Xu, M. (2021). Isoquercitrin protects HUVECs against high glucoseinduced apoptosis through regulating p53 proteasomal degradation. *Int J Mol Med.*, 48(1), 122. doi: 10.3892/ijmm.2021.4955.
  120. Liu, M, Liang, K, & Zhen, J. Sirt (2017). deficiency exacerbates podocyte injury and proteinuria through targeting Notch signaling. *Nat Commun.*, 8(1), 413. doi: 10.1038/s41467-017-00498-4.
  121. 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.

122. Liu, Y.H., Lu, M., Xie, Z.Z., Hua, F., Xie, L., Gao, J.H., ... Bian, J.S. (2014). Hydrogen sulfide prevents heart failure development via inhibition of renin release from mast cells in isoproterenol-treated rats. *Antioxid. Redox Signal.*, 20, 759–769. doi: 10.1089/ars.2012.4888.
123. Lovisa, S., LeBleu, V.S., Tampe, B., Sugimoto, H., Vадnagara, K., Carstens, J.L., Wu, C.C., Hagos, Y., Burckhardt, B.C., & Pentcheva-Hoang, T. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat. Med.*, 21, 998–1009. doi: 10.1038/nm.3902.
124. 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](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf)
125. Lu, M., Liu, Y.H., Goh, H.S., Wang, J.J., Yong, Q.C., Wang, R., & Bian, J.S. (2010). Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 21, 993–1002. doi: 10.1681/ASN.2009090949.
126. Luo, R., Hu, S., Liu, Q., Han, M., Wang, F., & Qiu, M. (2019). Hydrogen sulfide upregulates renal AQP-2 protein expression and promotes urine concentration. *FASEB J.*, 33, 469–483. 10.1096/fj.201800436r
127. Lv, B., Chen, S., Tang, C., Jin, H., Du, J., & Huang, Y. (2020). Hydrogen sulfide and vascular regulation - An update. *J Adv Res.*, 27, 85-97. doi: 10.1016/j.jare.2020.05.007.
128. Lytvyn, Y., Bjornstad, P., van Raalte, D.H., Heerspink, H.L., & Cherney, D.Z.I. (2020). The New Biology of Diabetic Kidney Disease-Mechanisms and Therapeutic Implications. *Endocr. Rev.*, 41, 202–231. doi: 10.1210/endrev/bnz010.
129. Ma, X., Ma, J., Leng, T., Yuan, Z., Hu, T., Liu, Q., & Shen, T. (2023). Advances in oxidative stress in pathogenesis of diabetic kidney disease and efficacy of TCM intervention. *Ren Fail.* 45(1), 2146512. doi: 10.1080/0886022X.2022.2146512.

130. 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.
131. Marcum, Z. A.; Forsberg, C. W.; Moore, K. P.; de Boer, I. H.; Smith, N. L.; Boyko, E. J.; & Floyd, J. S. (2018). Mortality associated with metformin versus sulfonyleurea initiation: A cohort study of veterans with Diabetes and chronic kidney disease. *J. Gen. Intern. Med*, 33, 155–165. doi: 10.1007/s11606-017-4219-3.
132. Mariano, F., Biancone, L. (2021). Metformin, chronic nephropathy and lactic acidosis: a multi-faceted issue for the nephrologist. *J Nephro*, 34(4), 1127-1135. doi: 10.1007/s40620-020-00941-8.
133. Márquez, E., Riera, M., Pascual, J., & Soler, M.J. (2015). Renin-angiotensin system within the diabetic podocyte. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 308(1), 1–10. doi: 10.1152/ajprenal.00531.2013.
134. Matsui, T., Higashimoto, Y., Nishino, Y., Nakamura, N., Fukami, K., & Yamagishi, S. (2017). RAGE-Aptamer Blocks the Development and Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 66, 1683–1695. <https://doi.org/10.2337/db16-1281>
135. Melnyk, A.V., Zaichko, N.V., Palamarchuk, I.V, & Strutynska, O.B. (2020). Effect of H<sub>2</sub>S metabolism modulators on the level of galectin-3 in aorta, heart and kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *European Journal of Biomedical and Life Sciences*, 4, 29-36, <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.
136. Mihara, M., & Uchiyama, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 86(1), 271–278. doi: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
137. Miranda-Díaz, A.G., Pazarín-Villaseñor, L., Yanowsky-Escatell, F.G., & Andrade-Sierra, J. (2016). Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy with

- Early Chronic Kidney Disease. *J Diabetes Res.*, 2016, 7047238. doi: 10.1155/2016/7047238.
138. Mohammad, H.M.F., Galal Gouda, S., Eladl, M.A., Elkazaz, A.Y., Elbayoumi, K.S., Farag, N.E., ... Zaitone, S.A. (2023). Metformin suppresses LRG1 and TGF $\beta$ 1/ALK1-induced angiogenesis and protects against ultrastructural changes in rat diabetic nephropathy. *Biomed Pharmacother.* doi: 10.1016/j.biopha.2022.114128.
139. Mohandes, S., Doke, T., Hu, H., Mukhi, D., Dhillon, P., & Susztak, K. (2023). Molecular pathways that drive diabetic kidney disease. *J Clin Invest.*, 133(4). doi: 10.1172/JCI165654.
140. Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Steppan, J., Jung, S.M., & Bhunia, A.K. (2011). Hydrogen Sulfide as Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor Sulphydrates Potassium Channels. *Circ Res.*, 109(11), 1259–1268. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.240242.
141. Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Augé, N., Pamplona, R., & Portero-Otín, M. (2009). Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal.*, 11(12), 3071–3109. DOI: 10.1089/ars.2009.2484
142. Neo, B.H., Kandhi, S., Ahmad, M., & Wolin, M.S. (2010). Redox regulation of guanylate cyclase and protein kinase G in vascular responses to hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2010;174:259–264. doi: 10.1016/j.resp.2010.08.024.
143. Ngowi, E.E., Sarfraz, M., Afzal, A., Khan, N.H., Khattak, S., Zhang, X., ... Wu, D.D. (2020). Roles of Hydrogen Sulfide Donors in Common Kidney Diseases. *Front Pharmacol.* Nov 19;11:564281. doi: 10.3389/fphar.2020.564281.
144. Nguyen Dinh Cat, A., Montezano, A.C., Burger, D., & Touyz, R.M. (2013). Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal.*, 19(10), 1110–1120. doi: 10.1089/ars.2012.4641.
145. Nna, V.U., Abu Bakar, A.B., Zakaria, Z., Othman Z.A., Jalil, N.A.C., & Mohamed, M. (2021). Malaysian Propolis and Metformin Synergistically

- Mitigate Kidney Oxidative Stress and Inflammation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Molecules.*, 26(11). doi: 10.3390/molecules26113441.
146. Olas, B. (2015). Hydrogen Sulfide in Signaling Pathways. *Clin Chim Acta.*, 439, 212–218. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.037.
147. Olson, K.R. (2015). Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Antioxid Redox Signal.*, 22(5), 377-397. doi: 10.1089/ars.2014.5930.
148. Olson, K.R. (2018). H<sub>2</sub>S and polysulfide metabolism: conventional and unconventional pathways. *Biochem. Pharmacol.*, 149, 77–90. doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.010.
149. Olson, K.R., Gao, Y., DeLeon, E.R., Markel, T.A., Drucker, N., Boone, D., ... Stahelin R.V. (2020). Extended hypoxia-mediated H<sub>2</sub>S production provides for long-term oxygen sensing. *Acta Physiol (Oxf)*. doi: 10.1111/apha.13368.
150. Padda, R.S., Shi, Y., Lo, C.S., Zhang, S.L., & Chan, J.S. (2015). Angiotensin-(1-7): a novel peptide to treat hypertension and nephropathy in diabetes? *J Diabetes Metab.*, 6(10). doi: 10.4172/2155-6156.1000615.
151. 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.
152. Patel, D.M., Bose, M., & Cooper, M.E. (2020). Glucose and Blood Pressure-Dependent Pathways-The Progression of Diabetic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.*, 21(6), 2218. doi: 10.3390/ijms21062218.
153. Paul, B.D., & Snyder, S.H. (2015). Protein Sulphydration. *Methods Enzymol.*, 555, 79–90. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.021
154. Paul, B.D., Snyder, S.H, & Kashfi, K. (2021). Effects of hydrogen sulfide on mitochondrial function and cellular bioenergetics. *Redox Biol.* doi: 10.1016/j.redox.2020.
155. Peixoto, E.B., Papadimitriou, A., & Teixeira, D.A. (2015). Reduced LRP6 expression and increase in the interaction of GSK3beta with p53 contribute to

- podocyte apoptosis in diabetes mellitus and are prevented by green tea. *J Nutr Biochem.*, 26(4), 416–430. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.11.012.
156. Pérez-Morales, R.E., del Pino, M.D., Valdivielso, J.M., Ortiz, A., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J.F. (2019). Inflammation in diabetic kidney disease. *Nephron*, 143, 12–16. doi: 10.1159/000493278.
157. Piragine, E. & Calderone, V. (2021). Pharmacological modulation of the hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) system by dietary H<sub>2</sub>S-donors: A novel promising strategy in the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus. *Phytother Res.*, 35(4), 1817-1846. doi: 10.1002/ptr.6923.
158. Polianskyte-Prause, Z., Tolvanen, T.A., Lindfors, S., Dumont, V., Van, M., Wang, H., ... Hautala, L.C. (2019). Metformin increases glucose uptake and acts renoprotectively by reducing SHIP2 activity. *FASEB J.*, 33, 2858–2869. doi: 10.1096/fj.201800529RR.
159. Qi, R., & Yang, C. (2018). Renal tubular epithelial cells: The neglected mediator of tubulointerstitial fibrosis after injury. *Cell Death Dis.* doi: 10.1038/s41419-018-1157-x.
160. Qian, X.; Li, X.; Ma, F.; Luo, S.; Ge, R.; & Zhu, Y. (2016). Novel hydrogen sulfide-releasing compound, S-propargyl-cysteine, prevents STZ-induced diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 473, 931–938. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.154>
161. Reifsnyder, P.C., Flurkey, K., Doty, R., Calcutt, N.A., Koza, R.A., & Harrison, D.E. (2022). Rapamycin/metformin co-treatment normalizes insulin sensitivity and reduces complications of metabolic syndrome in type 2 diabetic mice. *Aging Cell.*, 21(9). doi: 10.1111/accel.13666.
162. Ren, H., Shao, Y., Wu, C., Ma, X., Lv, C., & Wang, Q. (2020). Metformin alleviates oxidative stress and enhances autophagy in diabetic kidney disease via AMPK/SIRT1-FoxO1 pathway. *Mol Cell Endocrinol.* doi: 10.1016/j.mce.2019.110628.
163. Rico-Fontalvo, J., Aroca, G., Cabrales, J., Daza-Arnedo, R., Yáñez-Rodríguez, T., Martínez-Ávila, M.C., ... Raad-Sarabia M. (2022). Molecular

- Mechanisms of Diabetic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*, 23(15). doi: 10.3390/ijms23158668.
164. Ríos-González, B.B., Román-Morales, E.M., Pietri, R., & López-Garriga, J. (2014). Hydrogen Sulfide Activation in Hemeproteins: The Sulfheme Scenario. *J. Inorg. Biochem.*, 133, 78–86. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.01.013.
165. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., ... Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
166. Sanaye, M., Sathyapal, G., & Kulkarni, Y.A. (2022). Effect of *Costus pictus* per se and in combination with Metformin and Enalapril in streptozotocin induced diabetic nephropathy in rats. *J Diabetes Metab Disord.*, 21(2), 1349-1358. doi: 10.1007/s40200-022-01065-5.
167. Scindia, Y.M., Gholam, M.F., Waleed, A., Liu, L.P., Chacko, K.M., Desai, D., ... Alli, A.A. (2023). Metformin Alleviates Diabetes-Associated Hypertension by Attenuating the Renal Epithelial Sodium Channel. *Biomedicines.*, 11(2). doi: 10.3390/biomedicines11020305.
168. Selby, N. M., & Taal, M. W. (2020). An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. *Diabetes Obes Metab*, 22, 3–15. doi: 10.1111/dom.14007
169. Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., Ogasawara Y., ... Kimura H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms2371.
170. Sindhughosa, D.A., & Pranamartha, A.G.M.K. (2017). The involvement of proinflammatory cytokines in diabetic nephropathy: focus on interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )

- signaling mechanism. *Bali Med J.*, 6(1), 44–51.  
<https://doi.org/10.15562/bmj.v6i1.299>
171. Sircar, D., Chatterjee, S., Waikhom, R., Golay, V., Raychaudhury, A., Chatterjee, S., & Pandey, R. (2015). Efficacy of Febuxostat for Slowing the GFR Decline in Patients With CKD and Asymptomatic Hyperuricemia: A 6-Month, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Am. J. Kidney Dis.*, 66, 945–950. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.05.017.
  172. Song, A., Zhang, C., & Meng, X. (2021). Mechanism and application of metformin in kidney diseases: An update. *Biomed Pharmacother.* doi: 10.1016/j.biopha.2021.111454.
  173. Stephenne, X., Foretz, M., Taleux, N., van der Zon, G.C., Sokal, E., Hue, L., ... Guiga,s B. (2011). Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia.*, 54, 3101–3110. doi: 10.1007/s00125-011-2311-5.
  174. Stinghen, A.E., Massy, Z.A., Vlassara, H., Striker, G.E., & Boullier, A. (2016). Uremic toxicity of advanced glycation end products in CKD. *J Am Soc Nephrol.*, 27(2), 354–370. DOI: 10.1681/ASN.2014101047
  175. Strutynska, O.B., Melnyk, A.V., & Filchukov, D.O. (2020). The role of hydrogen sulphide in the development of experimental diabetic nephropathy. *Scientific Achievements: Projects, Research, Prospects: Materials of the Ist International Scientific-Practical Conference. Starobilsk, Ukraine, December 15-16, 2020 (P. 253 – 254)*. Luhansk Taras Shevchenko National University
  176. Stubbert, D., Prisyazhna, O., Rudyk, O., Scotcher, J., Burgoyne, J.R., & Eaton, P. (2014). Protein kinase G I $\alpha$  oxidation paradoxically underlies blood pressure lowering by the reductant hydrogen sulfide. *Hypertension.*, 64, 1344–1351. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04281.
  177. Su, H., Lei, C.T., & Zhang, C. (2017). Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update. *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2017.00405.
  178. 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.
179. Sun, H.J., Xiong, S.P., Wang, Z.C., Nie, X.W., & Bian, J.S. (2023). Hydrogen Sulfide in Diabetic Complications Revisited: The State of the Art, Challenges, and Future Directions. *Antioxid Redox Signal.*, 38(1-3), 18-44. doi: 10.1089/ars.2022.0028.
180. Sun, T., Liu, J., Xie, C., Yang, J., Zhao, L., & Yang, J. (2021). Metformin attenuates diabetic renal injury via the AMPK-autophagy axis. *Exp Ther Med.*, 21(6). doi: 10.3892/etm.2021.10010.
181. Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2017). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H<sub>2</sub>S Levels: H<sub>2</sub>S Donors and H<sub>2</sub>S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev.*, 69(4), 497–564. doi: 10.1124/pr.117.014050.
182. Tain, Y.L., Hsu, C.N., & Lu, P.C. (2018). Early short-term treatment with exogenous hydrogen sulfide postpones the transition from prehypertension to hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Hypertens.*, 40, 58–64. doi: 10.1080/10641963.2017.1313847.
183. Takahashi, T., & Harris, R.C. (2014). Role of endothelial nitric oxide synthase in diabetic nephropathy: lessons from diabetic eNOS knockout mice. *J Diabetes Res.* doi: 10.1155/2014/590541
184. Toda, N., Mukoyama, M., Yanagita, M., & Yokoi, H. (2018). CTGF in kidney fibrosis and glomerulonephritis. *Inflamm. Regen.* doi: 10.1186/s41232-018-0070-0.
185. Toth-Manikowski, S., & Atta, M.G. (2015). Diabetic kidney disease: pathophysiology and therapeutic targets. *J Diabetes Res.* doi: 10.1155/2015/697010.
186. Toyama, T., Furuichi, K., Ninomiya, T., Shimizu, M., Hara, A., Iwata, Y., ... Wada, T. (2013). The impacts of albuminuria and low eGFR on the risk of cardiovascular death, all-cause mortality, and renal events in diabetic patients: Meta-analysis. *PLoS ONE.* doi: 10.1371/journal.pone.0071810.

187. Tuttle, K.R., Agarwal, R., Alpers, C.E., Bakris, G.L., Brosius, F.C., Kolkhof, P., & Uribarri, J. (2022). Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease. *Kidney Int*, 102(2), 248-260. doi: 10.1016/j.kint.2022.05.012.
188. Walewska, A., Szewczyk, A., & Koprowski, P. (2018). Gas Signaling Molecules and Mitochondrial Potassium Channels. *Int J Mol Sci.*, 19(10). doi: 10.3390/ijms19103227.
189. Wang, F., Sun, H., Zuo, B., Shi, K., Zhang, X., Zhang, C., & Sun, D. (2021). Metformin attenuates renal tubulointerstitial fibrosis via upgrading autophagy in the early stage of diabetic nephropathy. *Sci Rep.*, 11(1). doi: 10.1038/s41598-021-95827-5.
190. Wang, F.Z., Zhou, H., Wang, H.Y., Dai, H.B., Gao, Q., Qian, P., & Zhou, Y.B. (2021). Hydrogen sulfide prevents arterial medial calcification in rats with diabetic nephropathy. *BMC Cardiovasc Disord.*, 21(1). doi: 10.1186/s12872-021-02307-9.
191. Wang, L., Wang, H.L., Liu, T.T., & Lan, H.Y. (2021). TGF-Beta as a Master Regulator of Diabetic Nephropathy. *Int. J. Mol. Sci.* doi: 10.3390/ijms22157881.
192. Wang, M., Tang, W., & Zhu, Y.Z. (2017). An update on AMPK in hydrogen sulfide pharmacology. *Front. Pharmacol.* doi: 10.3389/fphar.2017.00810.
193. Washio, K., Kusunoki, Y., Murase, T., Nakamura, T., Osugi, K., Ohigashi, M., ... Katsuno, T. (2017). Xanthine oxidoreductase activity is correlated with insulin resistance and subclinical inflammation in young humans. *Metab. Clin.*, 70, 51–56. doi: 10.1016/j.metabol.2017.01.031.
194. Watanabe, K., Sato, E., Mishima, E., Miyazaki, M., & Tanaka, T. (2022). What's New in the Molecular Mechanisms of Diabetic Kidney Disease: Recent Advances. *Int J Mol Sci*, 24(1). doi: 10.3390/ijms24010570.
195. Wiliński B., Wiliński J., Somogyi E., Piotrowska J. & Góralaska M. (2011). Amlodipine affects endogenous hydrogen sulfide tissue concentrations in different mouse organs. *Folia Med Cracov*, 51(1-4), 29-35.

196. 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.
197. Winiarska, A., Knysak, M., Nabrdalik, K., Gumprecht, J., & Stompór, T. (2021). Inflammation and Oxidative Stress in Diabetic Kidney Disease: The Targets for SGLT2 Inhibitors and GLP-1 Receptor Agonists. *Int J Mol Sci*, 22(19). doi: 10.3390/ijms221910822.
198. Wu, X.Q., Zhang, D.D., Wang, Y.N., Tan, Y.Q., Yu, X.Y., & Zhao, Y.Y. (2021). AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney. *Free Radic. Biol. Med.*, 171, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.025>
199. Xia, M., Chen, L., Muh, R.W., Li, P-L., & Li, N. (2009). Production and actions of hydrogen sulfide, a novel gaseous bioactive substance, in the kidneys. *J Pharmacol Exp Ther*, 329, 1056–1062. doi: 10.1124/jpet.108.149963.
200. Xiao, Q., Ying, J., Xiang, L., & Zhang, C. (2018). The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine (Baltimore)*, 97(44), 13065. doi: 10.1097/MD.00000000000013065.
201. 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.
202. 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.
203. Xue, J., Wang, L., Sun, Z., & Xing, C. (2019). Basic Research in Diabetic Nephropathy Health Care: A study of the Renoprotective Mechanism of Metformin. *J Med Syst.*, 43(8). doi: 10.1007/s10916-019-1412-4. mTOR

204. Yan, L.J. (2021). NADH/NAD<sup>+</sup> Redox Imbalance and Diabetic Kidney Disease. *Biomolecules.*, 11(5). doi: 10.3390/biom11050730.
205. Yang, C., Chen, X.C., Li, Z.H., Wu, H.L., Jing, K.P., Huang, X.R., ... Liu, H.F. (2021). SMAD3 promotes autophagy dysregulation by triggering lysosome depletion in tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. *Autophagy.*, 17, 2325–2344. doi: 10.1080/15548627.2020.1824694.
206. Yang, L., Li, D.X., Cao, B.Q., Liu, S.J., Xu, D.H., Zhu, X.Y., & Liu, Y.J. (2021). Exercise training ameliorates early diabetic kidney injury by regulating the H<sub>2</sub>S/SIRT1/p53 pathway. *FASEB J.*, 35(9). doi: 10.1096/fj.202100219R.
207. Yang, R., Liu, X.F., Ma, S.F., Gao, Q., Li, Z.H., & Jia, Q. (2016). Protective effect of hydrogen sulfide on kidneys of type 1 diabetic rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi Chin. J. Appl. Physiol.*, 32:181–184.
208. Yetik-Anacak, G., Sevin, G., Ozzayım, O., Dereli, M.V., & Ahmed, A. (2016). Hydrogen sulfide: a novel mechanism for the vascular protection by resveratrol under oxidative stress in mouse aorta. *Vascul Pharmacol.*, 87, 76–82. doi: 10.1016/j.vph.2016.08.003.
209. Yi, H., & Juhong, Y. (2021). Relationship between OGlcNAcylation and diabetic nephropathy. *Chin J Diabetes.*, 13(03), 282–286.
210. Yu, Y., Xiao, L., Ren, Z., Zhu, G., Wang, W., Jia, Y., Peng, A., & Wang, X. (2021). Glucose-induced decrease of cystathionine β-synthase mediates renal injuries. *FASEB J.*, 35(5). doi: 10.1096/fj.202002696RR.
211. Yuan, G., Vasavda, C., Peng, Y.J., Makarenko, V.V., Raghuraman, G., Nanduri, J., ... Prabhakar, N.R. (2015). Protein kinase G-regulated production of H<sub>2</sub>S governs oxygen sensing. *Sci Signal.* doi: 10.1126/scisignal.2005846.
212. Yuan, P., Xue, H., Zhou, L., Qu, L., Li, C., Wang, Z., ... Huang, Y. (2011). Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. *Nephrol. Dial. Transplant.*

- Off. Publ. Eur. Dial. Transplant. Assoc. Eur. Ren. Assoc.*, 26, 2119–2126. doi: 10.1093/ndt/gfq749.
213. Zaichko, N.V., Palamarchuk, I.V., & Strutynska, O.B. (2017). Propargylglycine and hydrogen sulfide effects on plasma galectin-3 in streptozotocin-induced diabetic rats. *VIII Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, 18-20 September 2017, Lublin, Poland: Programme and Book of Abstract (p. 56)*. Polihymnia. <https://dspace.vnmu.edu.ua/123456789/2746>
214. Zhang, B., Zhang, X., Zhang, C., Sun, G., & Sun, X. (2021). Berberine Improves the Protective Effects of Metformin on Diabetic Nephropathy in db/db Mice through Trib1-dependent Inhibiting Inflammation. *Pharm Res.*, 38(11), 1807-1820. doi: 10.1007/s11095-021-03104-x.
215. 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.
216. Zhang, H., Zhao, H., & Guo, N. (2021). Protective effect of hydrogen sulfide on the kidney (Review). *Mol Med Rep*, 24(4). doi: 10.3892/mmr.2021.12335.
217. Zhang, L., Niu, J., Zhang, X., & He, W. (2019). Metformin Can Alleviate the Symptom of Patient with Diabetic Nephropathy Through Reducing the Serum Level of Hcy and IL-33. *Open Med (Wars)*., 14, 625-628. doi: 10.1515/med-2019-0071.
218. Zhang, L., Xue, S., Hou, J., Chen, G., & Xu, Z.G. (2020). Endothelin receptor antagonists for the treatment of diabetic nephropathy: A meta-analysis and systematic review. *World J. Diabetes.*, 11, 553–566. doi: 10.4239/wjd.v11.i11.553.
219. Zhang, Z., Dong, H., Chen, J., Yin, M., & Liu, F. (2022). Effects of Metformin on Renal Function, Cardiac Function, and Inflammatory Response in Diabetic Nephropathy and Its Protective Mechanism. *Dis Markers*. doi: 10.1155/2022/8326767.

220. Zheng, W., Guo, J., & Liu, Z.S. (2021). Effects of metabolic memory on inflammation and fibrosis associated with diabetic kidney disease: an epigenetic perspective. *Clin Epigenetics.*, 13(1). doi: 10.1186/s13148-021-01079-5.
221. Zhou, X., An, G., & Lu, X. (2015). Hydrogen sulfide attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *Clin. Sci.*, 128, 325–335. doi: 10.1042/CS20140460.
222. Zhou, X., Feng, Y., Zhan, Z., & Chen, J. (2014). Hydrogen sulfide alleviates diabetic nephropathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *J. Biol. Chem.*, 289, 28827–28834. doi: 10.1074/jbc.M114.596593.
223. Zhou, Y., Ma, X. Y., Han, J. Y., Yang, M., Lv C., Shao, Y. ... Wang Q. Y. (2021). Metformin regulates inflammation and fibrosis in diabetic kidney disease through TNC/TLR4/NF- $\kappa$ B/miR-155-5p inflammatory loop. *World J Diabetes*, 12(1), 19-46. doi: 10.4239/wjd.v12.i1.19.
224. Zhou, Z. (2016). Regulation of soluble guanylyl cyclase redox state by hydrogen sulfide. *Pharmacol. Res.*, 111, 556–562. doi: 10.1016/j.phrs.2016.06.029.
225. 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.

## ДОДАТКИ

## ДОДАТОК А

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Роль системи гідроген сульфід у механізмах нефропротекторної дії метформіну за стрептозотоциніндукованого діабету. *Вісник медичних і біологічних досліджень*, 15(1), 15-21. <https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13352>.
2. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Морфологічні зміни тканин нирок щурів за експериментального цукрового діабету і на тлі корекції метформіном і модуляторами обміну гідроген сульфід. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 27(1), 10-16. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-02](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-02)
3. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2022). Вплив метформіну та його комбінації з модуляторами обміну гідроген сульфід на рівень глікемії і стан системи H<sub>2</sub>S у нирках щурів при стрептозотоциніндукованому діабеті. *Медична та клінічна хімія*, 24(4), 5-12. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2022.i4.13565>.
4. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2022). Роль модуляторів обміну гідроген сульфід у модифікації нефропротекторної дії метформіну за стрептозотоциніндукованого діабету. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 16(6), 387-396. <https://doi.org/10.33250/16.06.387>.
5. Паламарчук, І.В., Струтинська, О.Б., Мельник, А.В., & Заїчко, Н.В. (2020) Вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на стан системи H<sub>2</sub>S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках щурів

за стрептозотоцин-індукованого діабету. *Вісник проблем біології і медицини*, 157(3), 133-137. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137>.

6. Melnyk, A.V., Zaichko, N.V., Palamarchuk, I.V, & Strutynska, O.B. (2020). Effect of H<sub>2</sub>S metabolism modulators on the level of galectin-3 in aorta, heart and kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *European Journal of Biomedical and Life Sciences*, 4, 29-36, <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.

**Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:**

7. Заїчко, Н.В., Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В. (2016). *Застосування натрієвої солі гідрогену сульфїду для потенціювання вазопротективного ефекту антидіабетичних засобів* (Патент України №107767). Державна служба інтелектуальної власності України.

<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=224555>

8. Заїчко, Н.В., Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В. (2016). *Застосування натрієвої солі гідрогену сульфїду для потенціювання антидіабетичної дії метформїну* (Патент України №107765). Державна служба інтелектуальної власності України.

<https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=224553>

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

9. Strutynska, O.B., Melnyk, A.V., & Filchukov, D.O. (2020). The role of hydrogen sulphide in the development of experimental diabetic nephropathy. *Scientific Achievements: Projects, Research, Prospects: Materials of the 1st International Scientific-Practical Conference. Starobilsk, Ukraine, December 15-16, 2020* (P. 253 – 254). Luhansk Taras Shevchenko National University

10. Струтинська, О.Б., Мельник, А.В., & Штатько О.І., (2019). Вплив модуляторів обміну гідроген сульфїду на функціональний стан нирок щурів за експериментального цукрового діабету. *Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. (с. 240-241)*. Медична та клінічна хімія, 21(3, додаток). ТДМУ «Укрмедкнига».



<http://www.biochemistry.org.ua/index.php/uk/ubs-society-newsua/5590-11-10-2019-30-04-2019>

11. Струтинська, О.Б. (2019). Стан систему гідроген сульфїду в нирках щурів за експериментального цукрового діабету. *Перший крок в науку – 2019: матеріали XVI міжнародної конференції студентів та молодих вчених, м. Вінниця, 18-19 квітня, 2019 (с. 467).* ВНМУ. <https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/4436466> – 467.

12. Струтинська, О.Б., Мельник, А.В., Заїчко, Н.В., & Слободянюк, В.А. (2019). Стан H<sub>2</sub>S-індукованої вазодилатації ниркових артерій за експериментальної діабетичної нефропатії у щурів. *Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка, Київ, 27-30 травня 2019 р. (с. 33).* Фізіологічний журнал, 65(3). [https://fz.kiev.ua/journals/2019\\_V.65/2019-3sup/3-supplement\\_%202019.pdf](https://fz.kiev.ua/journals/2019_V.65/2019-3sup/3-supplement_%202019.pdf)

13. Zaichko, N.V., Palamarchuk, I.V., & Strutynska, O.B. (2017). Propargylglycine and hydrogen sulfide effects on plasma galectin-3 in streptozotocin-induced diabetic rats. *VIII Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, 18-20 September 2017, Lublin, Poland: Programme and Book of Abstract (p. 56).* Polihymnia. <https://dspace.vnmu.edu.ua/123456789/2746>

14. Заїчко, Н.В., Паламарчук, І.В., & Струтинська, О.Б. (2017). Вплив антидіабетичних засобів на вміст гідроген сульфїду та активність H<sub>2</sub>S-синтезуючих ензимів в органах щурів із стрептозотоциновим діабетом. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини (присвячена 60-річчю ТДМУ): матеріали LX науково-практичної конференції, м. Тернопіль, 14 червня, 2017 (с. 290–292).* ТДМУ «Укрмедкнига». <https://repository.tdmu.edu.ua/handle/1/8519>

15. Заїчко, Н.В., Паламарчук, І.В., Струтинська, О.Б., & Штатко, О.І. (2017). Вплив антидіабетичних засобів на систему цистатіонін-гама-ліази/ гідроген сульфїду в міокарді та нирках щурів. *Матеріали V Національного з'їзду фармакологів України, м. Запоріжжя, 18-20 жовтня 2017 р. (с. 46).*

<https://dspace.vnm.u.edu.ua/handle/123456789/2745?show=full&locale-attribute=uk>

16. Струтинська, О.Б., Паламарчук, І.В., & Заїчко, Н.В. (2016). Вплив гідроген сульфїду на антидіабетичний ефект метформїну за стрептозотоцинового діабету у щурів. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні», м Вінниця, 24 лютого 2016 р. (с. 91 – 93).* ВНМУ.

17. Струтинська, О.Б. (2016). Роль системи гідроген сульфїду в розвитку діабетичної нефропатії у щурів. *Матеріали 85-ої науково-практичної конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині», м Івано-Франківськ, 24 – 25 березня 2016 р. (с. 257-258).* ДВНЗ «Івано-франківський національний медичний університет».

<https://www.ifnm.u.edu.ua/uk/snt/85-naukovo-praktychna-konferentsiia-studentiv-i-molodykh-vchenykh>

#### АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 85-а науково-практична конференція студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині» (Івано-Франківськ, 24 – 25 березня 2016 р., форма участі – публікація тез).
2. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» (Вінниця, 24 лютого 2016 р., форма участі – усна доповідь та публікація тез).
3. VIII Lviv - Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Lublin, Poland, 18-20 September 2017, форма участі – постерна доповідь та публікація тез).
4. LX науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», присвячена 60-річчю ТДМУ (Тернопіль, 14 червня, 2017 р., форма участі – публікація тез).

5. V Національний з'їзд фармакологів України (Запоріжжя, 18-20 жовтня 2017 р., форма участі – публікація тез).
6. XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 27-30 травня 2019 р., форма участі – публікація тез).
7. XVI міжнародна конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2019» (Вінниця, 18-19 квітня 2019 р., форма участі – усна доповідь та публікація тез).
8. XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., форма участі - постерна доповідь та публікація тез).
9. Ist International Scientific-Practical Conference «Scientific Achievements: Projects, Research, Prospects» (Starobilsk, Ukraine, December 15-16, 2020, форма участі – публікація тез).

## ДОДАТОК Б-1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи  
Полтавського державного медичного університету  
д-мед. н., проф. Дворник В.М.



2021 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва пропозиції для впровадження:** роль Гідроген сульфїду в механізмах розвитку діабетичної нефропатії.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Струтинська Олена Борисівна

**3. Джерела інформації:**

1. Effect of H<sub>2</sub>S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.
2. Вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на стан системи H<sub>2</sub>S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках щурів за стрептозотосин-індукованого діабету/ І.В. Паламарчук, О.Б. Струтинська, А.В. Мельник, Н.В. Заїчко // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – № 3 (157). – С. 133-137. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137

**4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри біоорганічної та біологічної хімії Полтавського державного медичного університету у 2021 р.

**5. Результати впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.

Використання результатів досліджень О.Б. Струтинської в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення щодо механізмів розвитку діабетичної нефропатії та здобути нові дослідницькі навички щодо оцінки рівня профіброгених медаторів у нирках щурів.

**6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри кафедри біоорганічної та біологічної хімії Полтавського державного медичного університету, протокол № 5 від 17 вересня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біоорганічної та біологічної хімії,

д. мед. н., проф. Непорада К.С.

## ДОДАТОК Б-2



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Львівського національного медичного  
університету імені Данила Галицького  
д.мед.н., проф. Наконечний А.Й.

“31” серпня 2021 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва пропозиції для впровадження:** роль гідроген сульфїду в механізмах розвитку діабетичної нефропатії.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Струтинська Олена Борисівна

**3. Джерела інформації:**

1. Effect of H<sub>2</sub>S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/ELBLS-20-4-29-36>.
2. Вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на стан системи H<sub>2</sub>S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках шурів за стрептозотозин-індукованого діабету/ I.B. Паламарчук, О.Б. Струтинська, А.В. Мельник, Н.В. Заїчко // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – № 3 (157). – С. 133-137. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137

**4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри медичної біології ЛНМУ ім. Данила Галицького у 2020-2021 навчальному році.

**5. Результати впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.

Використання результатів досліджень О.Б. Струтинської в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення щодо механізмів розвитку діабетичної нефропатії та здобути нові дослідницькі навички щодо оцінки рівня профіброгенних медаторів у нирках шурів.

**6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри медичної біології ЛНМУ імені Данила Галицького, протокол № 1 від 31 серпня 2020 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри медичної біології  
Львівського національного медичного  
університету імені Данила Галицького  
д. б. н., професор

З.Д. Воробець

## ДОДАТОК Б-3

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Київського національного  
університету імені Т.Г. Шевченка

Остапченко Л. І.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва пропозиції для впровадження:** роль гідроген сульфїду в механізмах розвитку діабетичної нефропатії.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, асистент Струтинська Олена Борисівна

**3. Джерела інформації:**

1. Effect of H<sub>2</sub>S metabolism modulators on the level of galectin-3 in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / A.V. Melnyk, N.V. Zaichko, I.V. Palamarchuk, O.B. Strutynska // The European Journal of Biomedical and Life Sciences. – 2020. – No 4. – P.29-36. DOI: <https://doi.org/10.29013/EJBL.S-20-4-29-36>.
2. Вплив метформіну та його поєднання з натрій гідрогенсульфідом на стан системи H<sub>2</sub>S та асоційовані біохімічні порушення в міокарді та нирках щурів за стрептозотокцин-індукованого діабету/ І.В. Паламарчук, О.Б. Струтинська, А.В. Мельник, Н.В. Заїчко // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – № 3 (157). – С. 133-137. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-3-157-133-137

**4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри клінічної медицини навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Т.Г. Шевченка у 2021 р.

**5. Результати впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.

Використання результатів досліджень О.Б. Струтинської в науково-навчальному процесі дозволять здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення щодо механізмів розвитку діабетичної нефропатії та здобути нові дослідницькі навички щодо оцінки рівня профіброгенних медаторів у нирках щурів.

**6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри клінічної медицини навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Т.Г. Шевченка, протокол № 17 від 06.09.2021 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри клінічної медицини  
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського  
національного університету імені Т.Г. Шевченка,  
д. мед. н., професор

Маєвський О.С.

## ДОДАТОК Б-4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
 Проректор з наукової роботи  
 Вінницького національного медичного  
 університету імені М.І. Пирогова  
 проф. Олег ВЛАСЕНКО  
 2023 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Роль гідроген сульфїду в механїзмах нефропротекторної дїї метформїну за діабетичної нефропатїї.
2. **Установа, її адреса, виконавцї:** кафедра біологічної та загальної хїмїї Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Струтинська Олена Борисівна
3. **Джерела інформації :**
  1. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Роль системи гідроген сульфїду в механїзмах нефропротекторної дїї метформїну за стрептозотоцинїндукованого діабету. Вісник медичних і біологічних досліджень, 1(15), 15-21. <https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13352>.
  2. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Морфологічні зміни тканин нирок щурів за експериментального цукрового діабету і на тлі корекції метформїном і модуляторами обміну гідроген сульфїду. Вісник Вінницького національного медичного університету, 27(1), 10-16. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-02](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-02)
4. **Де і коли впроваджено:** у науково – педагогічний процес кафедри фармакологїї ВНМУ ім. М.І. Пирогова у 2022 – 2023 навчальному році
5. **Результати впровадження:** науково – навчальний процес кафедри. Використання результатів досліджень О.Б. Струтинської в науково – навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення щодо молекулярних механїзмів нефропротекторної активностї метформїну за експериментального цукрового діабету
6. **Завваження та пропозиції:** не вносилися

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної хїмїї ВНМУ ім. М.І. Пирогова, протокол № 9 від 7.04. 2023р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакологїї  
 д. мед. н., професор

Наталія ВОЛОЩУК

## ДОДАТОК Б-5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
 Проректор з наукової роботи  
 Вінницького національного медичного  
 університету імені М.І. Пирогова  
 проф. Олег ВЛАСЕНКО  
 «*Олег Власенко*» 2023 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Роль гідроген сульфїду в механїзмах нефропротекторної дїї метформїну за діабетичної нефропатїї.
2. **Установа, її адреса, виконавцї:** кафедра біологічної та загальної хїмїї Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, старший викладач Струтинська Олена Борисівна
3. **Джерела інформації:**
  1. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Роль системи гідроген сульфїду в механїзмах нефропротекторної дїї метформїну за стрептозотозинїндукованого діабету. Вісник медичних і біологічних досліджень, 1(15), 15-21. <https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13352>.
  2. Струтинська, О.Б., & Мельник, А.В. (2023). Морфологічні зміни тканин нирок щурів за експериментального цукрового діабету і на тлі корекції метформїном і модуляторами обміну гідроген сульфїду. Вісник Вінницького національного медичного університету, 27(1), 10-16. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-02](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-02)
4. **Де і коли впроваджено:** у науково – педагогічний процес кафедри біологічної та загальної хїмїї ВНМУ ім. М.І. Пирогова у 2022 – 2023 навчальному році
5. **Результати впровадження:** науково – навчальний процес кафедри. Використання результатів досліджень О.Б. Струтинської в науково – навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення щодо молекулярних механїзмів нефропротекторної активності метформїну за експериментального цукрового діабету
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної хїмїї ВНМУ ім. М.І. Пирогова, протокол № 11 від 11.04 2023 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біологічної  
та загальної хїмїї  
д. мед. н., професор



Наталія ЗАІЧКО