

На правах рукописи

БАЙРАШЕВА

Валентина Кузьминична

**ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА И ВИЛДАГЛИПТИНА
НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА.
КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

14.01.02 – Эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор

Гринева Елена Николаевна

Научный консультант – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН

Галагудза Михаил Михайлович

Официальные оппоненты: **Климонтов Вадим Валерьевич**, доктор медицинских наук, доцент, профессор РАН, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», заместитель руководителя по научной работе

Нагибович Олег Александрович, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, начальник научно-исследовательского центра

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород

Защита состоится «_____» _____ 20 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 208.054.03 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2, www.almazovcentre.ru).

Автореферат разослан «_____» _____ 20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.054.03,
кандидат медицинских наук

Леонова Ирина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Диабетическая нефропатия (ДН) при сахарном диабете (СД) 2 типа занимает одну из лидирующих позиций среди причин развития терминальной почечной недостаточности, сердечно-сосудистых катастроф, инвалидизации и смертности (IDF, 2015; М.В.Шестакова, И.И.Дедов, 2009; О.В.Маслова, Ю.И.Сунцов, 2011; А.Т.Reutens, 2013). В этих условиях актуальным становится выбор оптимального сахароснижающего препарата (ССП), способного не только длительно поддерживать компенсацию заболевания, но и благоприятно воздействовать почку, являющуюся органом-мишенью при СД, а также ослаблять факторы риска её поражения.

С точки зрения наличия возможных нефропротективных эффектов перспективными представляются ССП, повышающие уровень глюкагоноподобного пептида-1 за счёт ингибирования разрушающего его фермента дипептидилпептидазы 4 типа (ДПП-4) (S.E.Inzucchi et al., 2015). Повышение уровня глюкагоноподобного пептида-1 обеспечивает регуляцию секреции инсулина и глюкагона, а также стимулирует натрийурез и противовоспалительный потенциал почек (V.Gupta, 2012). Плейотропный эффект ингибиторов ДПП-4 на почку может реализовываться также за счёт снижения деградации других гормоноподобных субстанций с вазоактивными, иммуномодулирующими, натрийуретическими и антиоксидантными свойствами (А.И.Корбут, В.В.Климонтов, 2016; L.Juillerat-Jeanneret, 2014; M.Haluzik et al., 2013; U.Pancharakesan, C.Pollock, 2015). Эффекты на почку ингибиторов ДПП-4 с преимущественно почечным путём элиминации также могут осуществляться при непосредственном контакте препарата с трансмембранной формой ДПП-4 на поверхности клеток проксимальных канальцев и капилляров клубочка (M.J.Helbert et al., 1997; L.Pala et al., 2003).

Ингибитор ДПП-4 вилдаглиптин, на 85% выводящийся почками (Y.-L.He, 2012), продемонстрировал способность замедлять развитие морфофункциональных признаков ДН за счёт уменьшения процессов воспаления и оксидативного стресса у крыс с СД 1 типа и крыс с генетическим дефектом рецептора лептина (линия Zucker Diabetic Fatty) (W.J.Liu et al., 2012; P.Vavrines et al., 2014; Y.Wang et al., 2012). Клинические данные, однозначно демонстрирующие нефропротективный потенциал вилдаглиптина, отсутствуют (S.Tani et al., 2013; W.M.Kolaczynski et al., 2016). При этом возможности экстраполяции полученных экспериментальных данных в клиническую практику ограничены. Это связано с низкой встречаемостью мутации гена рецептора лептина в популяции и невозможностью воспроизведения в экспериментальных моделях СД 1 типа таких важных компонентов поражения почек при СД 2 типа, как избыточная масса тела, инсулинорезистентность и дислипидемия (G.H.Tesch, T.J.Allen, 2007; R.G.Peterson et al., 2015). Существующие негенетические модели ДН при СД 2 типа у грызунов не соответствуют всем критериям, необходимым для их полноценной валидации (The US-based Animal Models of Diabetes Complications Consortium, <https://diacomp.org>).

Ещё одним ССП, гликемический эффект которого частично опосредуется влиянием на инкретиновый баланс, является метформин (A.Maida et al., 2011; Е.А.Пигарова, 2011). Плейотропные эффекты метформина на сердечно-сосудистую систему объясняются его способностью благоприятно воздействовать на многие метаболические нарушения (D.Klachko, A.Whaley-Connell, 2011; Е.Н.Кравчук, М.М.Галагудза, 2013). Несмотря на то, что схожие факторы риска имеют важное значение в патогенезе ДН при СД 2 типа (М.В.Шестакова, И.И.Дедов, 2009; K.Tziomalos, V.G.Athyros, 2015), данные о позитивном влиянии метформина на почки не столь однозначны и в основном относятся к экспериментальным работам (Т.М.Lougo et al., 2011; А.А.Alhaider et al., 2011; J.Kim et al., 2012). Не исключено, что для выявления нефропротективного потенциала препарата недостаточно использовать рутинные маркеры повреждения и дисфункции почек. Учитывая способность метформина ослаблять процессы, связанные с повреждением канальцевого эпителия (Y.Takiyama et al., 2011; M.Rafieian Koraei, A.Baradaran, 2014), играющего важную роль в патогенезе ДН (V.Vallon, S.C.Thomson, 2012), целесообразным представляется также оценка изменения тубулоинтерстиция и маркеров его поражения на фоне терапии метформином.

Известен ряд молекул, экспрессируемых эпителиоцитами канальцев (NGAL, L-FABP и KIM-1), выделение которых с мочой отражает степень тубулоинтерстициального повреждения и фиброза (S.Nakagawa et al., 2015; T.L.Nickolas et al., 2012; M.Hisamichi et al., 2017). В литературе обсуждается возможность оценки уровня их экскреции для раннего выявления поражения почки при СД. В качестве кандидата на маркер ранней диагностики ДН при СД 2 типа рассматривается также коллаген IV типа, экскреция которого коррелирует с выраженностью гломерулосклеротических изменений (В.В.Климонтов и соавт., 2015; K.V.Mahendran et al., 2016). В доступной литературе отсутствуют данные о влиянии терапии метформином и вилдаглиптином на перечисленные маркеры канальцевого и клубочкового поражения.

Цель исследования

В клинко-экспериментальном исследовании изучить маркеры повреждения почек при сахарном диабете 2 типа и оценить нефропротективные свойства метформина и вилдаглиптина.

Задачи исследования

1. Разработать экспериментальную модель диабетической нефропатии, соответствующую ранним стадиям почечных изменений при сахарном диабете 2 типа.
2. В экспериментальной части исследования оценить влияние терапии метформином и вилдаглиптином на характер структурных и функциональных изменений почки у крыс с сахарным диабетом 2 типа.
3. Сравнить экскрецию маркеров канальцевого повреждения (NGAL и L-FABP) и клубочкового фиброгенеза (коллаген IV типа) у здоровых участников и больных сахарным диабетом 2 типа, получающих терапию инсулином, в зависимости от градации альбуминурии и скорости клубочковой фильтрации.

4. Оценить связь экскреции NGAL, L-FABP и коллагена IV типа с классическими маркерами почечного поражения у больных сахарным диабетом 2 типа на инсулинотерапии.
5. Изучить динамику исследуемых маркеров поражения почек через 6 месяцев после добавления к инсулинотерапии метформина или вилдаглиптина.

Научная новизна

Разработана экспериментальная модель диабетической нефропатии при никотинамид-стрептозотоциновом сахарном диабете 2 типа у крыс.

У крыс с диабетической нефропатией, получающих метформин, продемонстрировано значимое снижение экскреции маркеров повреждения канальцев NGAL и KIM-1 по сравнению с крысами с сахарным диабетом 2 типа, не получавшими препарат.

Показано, что у больных сахарным диабетом 2 типа экскреция NGAL значимо повышена даже при отсутствии снижения фильтрационной функции и обратно коррелирует со скоростью клубочковой фильтрации, рассчитанной по цистатину С, независимо от выраженности альбуминурии.

Установлено, что у больных сахарным диабетом 2 типа, получающих терапию инсулином, добавление вилдаглиптина в течение 6 месяцев сопровождается уменьшением экскреции коллагена IV типа и повышением скорости клубочковой фильтрации, рассчитанной с использованием цистатина С.

Продemonстрировано, что назначение метформина больным сахарным диабетом 2 типа, получающим терапию инсулином, приводит к значимому уменьшению экскреции маркеров повреждения канальцев NGAL и L-FABP.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическое значение работы состоит в том, что полученные данные дополняют научные знания о механизмах раннего повреждения почечных канальцев при сахарном диабете 2 типа.

Подтверждена возможность использования оценки уровня экскреции NGAL и L-FABP у больных сахарным диабетом 2 типа без признаков хронической болезни почек для ранней диагностики почечного канальцевого поражения. Показана низкая информативность определения экскреции коллагена IV типа для диагностики субклинических проявлений хронической болезни почек у больных сахарным диабетом 2 типа.

Продemonстрирована возможность использования определения экскреции NGAL, L-FABP и коллагена IV типа у больных сахарным диабетом 2 типа для дифференциальной оценки почечных эффектов воздействия медикаментозной терапии.

Показана способность вилдаглиптина и метформина не только улучшать компенсацию сахарного диабета 2 типа, но и оказывать плейотропные эффекты на почки.

Методология и методы исследования

В поперечное исследование было включено 84 больных СД 2 типа на инсулинотерапии, проходивших лечение на базе ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России и в СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 120» города Санкт-Петербурга. Группу контроля составили 26 соответствующих по полу и возрасту добровольцев без СД 2 типа и хронической болезни почек (ХБП) из числа сотрудников НМИЦ им. В.А. Алмазова, а также проходивших диспансеризацию в СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 120». Для реализации поставленной цели были проведены клинический опрос и осмотр, лабораторная оценка состояния углеводного обмена и показателей почечной функции. 66 пациентов из числа включённых в поперечное исследование участвовали в проспективном рандомизированном открытом контролируемом исследовании, в котором те же параметры оценивались через 6 месяцев после продолжения инсулинотерапии или добавления к ней метформина или вилдаглиптина. Все участники исследования подписывали информированное согласие.

В хроническом эксперименте, проводившемся на базе вивария Института экспериментальной медицины ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, на 45 самцах крыс стока Wistar, у которых индуцировалась ДН при экспериментальном СД 2 типа, в динамике оценивались показатели углеводного обмена и почечные показатели. По окончании эксперимента проводились морфологическое исследование (светлооптическая и электронная микроскопия) и морфометрический анализ.

Основные положения, выносимые на защиту

Морфофункциональные изменения почки у крыс, характерные для сахарного диабета 2 типа и диабетической нефропатии, могут быть получены путём комбинации односторонней нефрэктомии, питания с высоким содержанием жира с гипергликемией, индуцированной внутрибрюшинным введением никотинамида и стрептозотцина.

Введение метформина животным с сахарным диабетом 2 типа сопровождается уменьшением экскреции маркеров повреждения канальцев, в то время как вилдаглиптин уменьшает выраженность изменений лабораторных маркеров и морфологических признаков диабетической нефропатии.

У больных сахарным диабетом 2 типа повышение экскреции маркеров повреждения почек L-FABP и NGAL наблюдают ещё до появления альбуминурии (выше 30 мг/г креатинина) и снижения скорости клубочковой фильтрации.

У больных сахарным диабетом 2 типа экскреция маркеров повреждения почек (L-FABP, NGAL и коллагена IV типа) нарастает по мере снижения скорости клубочковой фильтрации и увеличения альбуминурии.

У больных сахарным диабетом 2 типа, получающих инсулин, терапия вилдаглиптином в течение 6 месяцев приводит к снижению экскреции маркера клубочкового фиброгенеза коллагена IV типа и повышению фильтрационной функции почек, а терапия метформином ассоциирована со снижением экскреции маркеров повреждения канальцев NGAL и L-FABP.

Личный вклад диссертанта

Участие автора в диссертационном исследовании выразилось в проведении обзора литературы по тематике работы, планировании исследования, наборе участников, проведении экспериментального и клинического исследований, выполнении подготовки биоматериала для морфологического исследования, ультраструктурного и лабораторного этапов работы, проведении морфометрического анализа, обобщении и статистическом анализе полученных данных, подготовке статей и докладов на конференциях и конгрессах.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования включены в программу образовательного цикла по диабетологии «Мультидисциплинарный подход к ведению пациентов с СД 2 типа и коморбидной патологией», организованного Институтом медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А.Алмазова» Минздрава России и внедрены в учебный процесс на кафедре патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И. П. Павлова» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов обеспечивается достаточным числом обследованных участников исследования и экспериментальных животных в группах, использованием комплекса современных методов лабораторного и морфологического исследований и статистической обработки данных в соответствии с поставленными целью и задачами.

Материалы диссертации были представлены в виде устных и постерных докладов на российских и международных конференциях и конгрессах: «Актуальные проблемы патофизиологии-2014» (2014, Санкт-Петербург); The International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes 2014 (Австрия) и 2015 (Франция); «Трансляционные исследования в инновационном развитии здравоохранения» (2014, Санкт-Петербург); European Congress of Endocrinology 2014 (Польша), 2015 (Ирландия), 2017 (Лиссабон); VII Ежегодная научная конференция молодых ученых и специалистов ФГБУ «ФМИЦ имени В. А. Алмазова» (2015, Санкт-Петербург); European Society of Cardiology Congress 2015 (Великобритания) и 2016 (Италия); 4-й Немецко-российский семинар по эндокринологии и диабетологии (2015, Санкт-Петербург); 51st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (2015, Швеция); на круглом столе среди победителей конкурса Грантов Правительства Санкт-Петербурга для аспирантов вузов, отраслевых и научных институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга (2014, Санкт-Петербург). Результаты диссертационной работы включены в отчет о научно-исследовательской работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России по теме государственного задания на 2012-2014 гг. и 2015-2017 гг.

По материалам диссертации опубликовано 25 печатных работ, в том числе 8 статей в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» Высшей Аттестационной Комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации; 17 тезисов как в отечественных (7), так и в зарубежных (10) сборниках трудов научных конференций.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, иллюстрирована 20 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов (экспериментальная и клиническая части) и заключений по ним, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Указатель литературы включает 215 источников, из них 43 отечественных и 172 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование одобрено Этическим комитетом НМИЦ им. В.А. Алмазова.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования и структура эксперимента

Исследование проведено на 45 половозрелых самцах крыс стока Wistar, которых содержали в условиях 12/12-часового светотемнового режима при свободном доступе к питьевой воде и пище. Крысам после наркотизирования пентобарбиталом натрия (50 мг/кг внутривенно) выполняли правостороннюю нефрэктомию (по методике M.Sugano et al., 2006) и содержали на стандартном лабораторном пищевом рационе.

Через 3 недели 35 крыс, у которых в последующем моделировался СД, были переведены на 5 недель на высокожировое питание с добавлением говяжьего сала с итоговой общей калорийностью 450 ккал/100 г (J.L.Logan, 1996). После его окончания крысам индуцировался СД 2 типа посредством внутривенного однократного последовательного введения никотинамида (НА) в дозе 230 мг/кг (Herba Nemosan) и стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 65 мг/кг (Sigma Aldrich) с интервалом в 15 минут (S.Islam, H.Choi, 2007). 10 геминефрэктомированных крыс без СД 2 типа (группа контроль без СД 2) на протяжении всего эксперимента получали стандартный гранулированный корм для грызунов (ООО «Лабораторкорм») с общей калорийностью 310 ккал/100 г. Крысам контрольной группы в аналогичные сроки вместо НА и СТЗ внутривенно вводились их растворители (0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия и 0,5 мл натриевого цитратного буфера, соответственно).

Через 7 дней после введения НА-СТЗ/их растворителей выполнялся оральный глюкозотолерантный тест по стандартной методике (R.G.Peterson et al., 2015). После этого крысы с подтверждённым экспериментальным СД 2 типа (в глюкозотолерантном тесте гликемия натощак 9,0-14,0 ммоль/л и более чем 2-кратное повышение

рассчитанной площади под кривой глюкозы) случайным образом были разделены на 3 группы в зависимости от назначаемых через 11 недель на последующие 10 недель препаратов (растворённых в питьевой воде):

- 1) крысы с СД 2 типа на терапии метформином (Merck Sante s.a.s.) в дозе 300 мг/кг/сутки – группа СД 2 (метформин), n=8;
- 2) крысы с СД 2 типа на терапии вилдаглиптином (Novartis Pharma Stein) в дозе 8 мг/кг/сутки – группа СД 2 (вилдаглиптин), n=8;
- 3) крысы с СД 2 типа, вместо исследуемых ССП получавшие крахмал 50 мг/л – группа СД 2 (контроль), n=7. При подъёмах гликемии выше 14 ммоль/л в ходе эксперимента крысам вводился подкожно инсулин изофан 1-2 единицы.

Лабораторные исследования

1 раз в 10 дней определяли глюкозу плазмы крови натошак из хвостовой вены (глюкометром OneTouch Ultra, Johnson and Johnson) и массу тела.

На 10-й, 20-й неделе, а также по окончании исследования на 30-й неделе в крови определяли: на анализаторе BioRad d10 – гликированный гемоглобин (HbA1c); с использованием реактивов и анализатора Cobas Integra 400 plus (Roche) – креатинин (сыворотки крови и мочи), глюкозу, холестерин, триглицериды, мочевины; на фотометре ELx800 – инсулин (ALPCO Diagnostics). Рассчитывали индекс инсулинорезистентности НОМА-IR по формуле (1) (L.Solskov et al., 2010):

$$\text{НОМА-IR} = \frac{\text{глюкоза плазмы крови натошак (ммоль/л)} \times \text{инсулин натошак (пмоль/л)}}{155} \quad (1)$$

В аналогичные сроки у крыс собирали суточную мочу в индивидуальных метаболических камерах. На фотометре ELx800 в дублях с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) определяли концентрацию альбумина (Assaypro), а также молекулы почечного повреждения-1 (КИМ-1) и ассоциированного с нейтрофильной желатиназой липокалина (NGAL) ИФА-наборами Abscam. Рассчитывался клиренс креатинина (мл/мин/кг) по формуле (2):

$$\text{Клиренс креатинина} = \frac{\text{объём мочи за 24 ч (мл)} \times \text{креатинин мочи (ммоль/л)}}{1400 \text{ (мин)} \times \frac{\text{креатинин сыворотки (мкмоль/л)} \times 0,001}{\text{масса крысы (кг)}}} \quad (2)$$

Морфологические исследования

Световая микроскопия и морфометрический анализ выполнялись на базе Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Серийные парафиновые полутонкие срезы почечной паренхимы после окрашивания просматривались на инвертированном микроскопе Leica DMI6000.

Окрашенные реактивом Шиффа (Bio-Optica) срезы использовали для полуколичественного расчёта *индекса мезангиальной экспансии* (по методике R.Choi et al., 2011) и *индекса гломерулосклероза* (по методике L.Raij et al., 1984). Для этого не менее 35 клубочков в срезе были просмотрены и оценены в баллах от 1 до 4, после чего

для каждой почки был рассчитан средний балл (в произвольных единицах). Срезы, окрашенные анилиновым синим по Массону (Bio-Optica) и обработанные в программе ImageJ 1.5, использовали для полуколичественного расчёта *индекса тубулоинтерстициального фиброза* по методике X.Bai et al. (2016). Для групп рассчитывались средние значения всех индексов (в произвольных единицах).

Трансмиссионная электронная микроскопия выполнялась на электронном микроскопе Libra 120 plus (Carl Zeiss Microscopy GmbH) на базе ЦКП БИН им. В.Л.Комарова РАН. Пробоподготовку осуществляли путём погружения небольших кусочков почечной коры на 12 часов в раствор 2,5% глутаральдегида, вторичной фиксации в 1,0% четырёхокси осмия и обезвоживания в спиртах и ацетоне возрастающей крепости с последующим заключением в эпоксидную смолу. Морфометрическую оценку толщины гломерулярной базальной мембраны осуществляли по методике R.Choi et al. (2011) в не менее чем 30 выбранных точках (каждый 1 мкм длины ГБМ), используя программу для анализа изображений ImageJ версия 1.5.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика обследованных участников и дизайн

В поперечное исследование включили 84 больных СД 2 типа и соответствующих по полу и возрасту 26 участников без СД 2 типа и ХБП с сопоставимыми показателями АД и липидограммы, без тяжёлых макрососудистых заболеваний в анамнезе.

Критерии включения больных СД 2 типа: мужчины и женщины европеоидной расы 45-70 лет с СД 2 типа на терапии инсулином с близкими к индивидуальному целевым показателями гликемии (превышение HbA1c не более 0,5%) и АД, с альбуминурией менее 200 мг/л и скоростью клубочковой фильтрации, рассчитанной по креатинину сыворотки по формуле СКД EPI (pСКФкр), ≥ 60 мл/мин/1,73 м² (A.S.Levey et al., 2009).

Критериями невключения являлись: тяжёлые микро- и макрососудистые осложнения СД 2 типа, острые сердечно-сосудистые события в анамнезе менее 6 месяцев до начала исследования; патологически изменённый мочевой осадок; первично-почечная патология; некорректируемая дислипидемия; злоупотребление алкоголем; применение нефротоксичных препаратов за последние 6 месяцев; ИМТ ≥ 40 кг/м²; печёночная и тиреоидная дисфункция; онкологическая и системная аутоиммунная патология; вегетарианство; беременность, лактация; лактацидоз в анамнезе; гиперчувствительность к любым компонентам таблетки метформина или вилдаглиптина.

Критериями досрочного исключения из проспективного исследования были: острые состояния; изменение терапии и питьевого режима между визитами.

Всем участникам были выполнены клиническое обследование, инструментально-лабораторные исследования. Из 84 больных СД 2 типа 70 пациентов приняли участие в проспективном рандомизированном открытом контролируемом исследовании, в котором определяемые параметры оценивались также через 6 месяцев. 1 раз в месяц осуществлялся телефонный опрос.

С помощью генератора случайных чисел 70 больных СД 2 типа были рандомизированы на 3 группы в зависимости от назначаемой на последующие 6 месяцев сахароснижающей терапии:

- 1) контрольная группа И, продолжившая получать инсулинотерапию (n=23);
- 2) группа И+В комбинированного лечения инсулином и вилдаглиптином 50 мг в сутки (препарат Галвус, Novartis Pharma Stein), n=24;
- 3) группа И+М комбинированного лечения инсулином и метформином 1500 мг в сутки (препарат Глюкофаж, Merck Sante s.a.s.), n=23.

Клинико-инструментальное обследование

У всех включенных в исследование анализировали жалобы, хронические заболевания, медикаментозную терапию, статус курения. Измеряли АД (после 5 минут отдыха трижды с 10-минутным интервалом), оценивали рост и вес для расчёта индекса массы тела (ИМТ) по формуле Кетле. У больных СД 2 типа изучалась история заболевания и его осложнений. В анализ включались 3 последних показателя постпрандиальной и глюкозы плазмы натощак, оценивалась частота гипогликемий (E.R.Seaquist et al., 2013). Проводилось стандартное исследование неврологического статуса, при необходимости – офтальмологическая диагностика (под ред. И.И.Дедова, 2017). По показаниям выполнялось ультразвуковое исследование почек, мочевыводящих путей, предстательной железы.

Лабораторные исследования

Определяемые показатели мочи. Дважды с интервалом 3-5 дней осуществлялся сбор средней утренней порции мочи. Методом ИФА на фотометре ELx800 (США) определяли уровень коллагена IV типа (Argutus Medical) и печеночной формы белка, связывающего жирные кислоты (L-FABP) (Hycult Biotech), уровень ассоциированного с нейтрофильной желатиназой липокалина (NGAL) – иммунохемилюминисцентным методом на анализаторе Architect i2000 (Abbott). На анализаторе Cobas Integra 400 plus (Roche) определялись креатинин (энзиматический метод) и альбумин (иммунотурбидиметрия). Рассчитывались соотношения маркеров к креатинину мочи (Кр.): альбумин-креатининовое соотношение (АКС), а также соотношения коллаген IV типа/Кр., L-FABP/Кр. и NGAL/Кр.

Определяемые показатели крови. В аналогичные сроки забор крови из локтевой вены осуществлялся натощак в утренние часы. Уровни креатинина, мочевины, общего холестерина, триглицеридов и цистатина С сыворотки определялись на анализаторе Cobas Integra 400 plus (Roche), HbA1c – на хроматографе Bio Rad d10. Уровень креатинина определялся энзиматическим методом, стандартизованным относительно референсного интервала масс-спектрометрии с изотопным разбавлением (L.Inker et al., 2012). СКФ рассчитывалась по формулам, предложенным группой учёных, сотрудничающих в области эпидемиологии хронических заболеваний почек (СКД-EPI) на основании определения креатинина (pСКФкр), цистатина С в сыворотке (pСКФцис), и при их совместном применении (pСКФкр-цис) (A.Levey et al., 2009; L.Inker et al., 2012).

Статистическая обработка

Статистическую обработку и построение графиков производили в программах SPSS 20.0 (SPSS Inc.), Statistica 6.0 (StatSoft) и GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Использовались параметрические критерии, если предполагалось равенство дисперсий (t-критерий для независимых и связанных выборок, однофакторный дисперсионный анализ, в том числе с повторными измерениями, с post-hoc-тестом Тьюки). В противном случае – их непараметрические аналоги (критерии Манна-Уитни и Уилкоксона, ANOVA Краскела-Уоллиса с post-hoc-тестом Данна). При заметно асимметричном распределении показатели логарифмировали. С помощью расчёта размера выборки и мощности было установлено, что 22 пациента в группе обеспечат 80%-ю мощность для демонстрации 15%-го снижения альбуминурии. Для сравнения распределения качественных признаков использовался критерий хи-квадрат. Связь переменных оценивалась с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена, а также в линейном и множественном регрессионном анализе. Использовали анализ классификаций с применением ROC-кривых для расчёта оптимального порога отсечения для уровня маркеров повреждения почек. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная модель диабетической нефропатии при СД 2 типа

Результаты орального глюкозотолерантного теста представлены на Рисунке 1 (а). Согласно полученным данным, СД 2 типа развился у 70% крыс, получавших высокожировое питание с 3 по 8 недели с последующим введением НА и СТЗ. При этом площадь под кривой глюкозы (0-120 мин) в группе СД 2 составила $1777,1 \pm 168,1$, а в контроле – $882,3 \pm 86,9$ ммоль•мин/л ($p = 0,003$). Различия в показателях гликемии сохраняли свою значимость до окончания эксперимента на 30-й неделе (Рисунок 1 (б)).

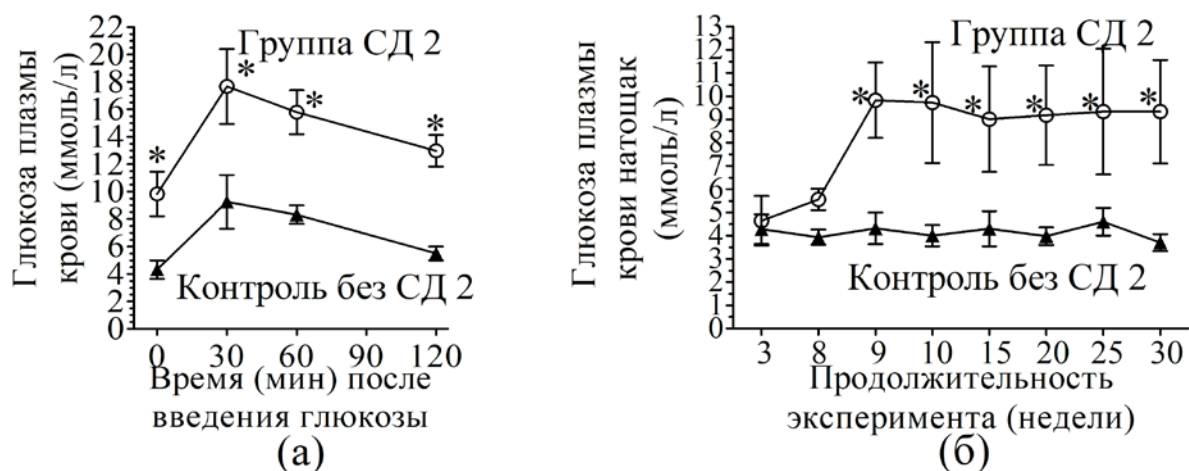


Рисунок 1 – Показатели глюкозы плазмы при проведении глюкозотолерантного теста (а) и при оценке после 8 часов голода на протяжении хронического эксперимента (б) у крыс с СД 2 типа и в контрольной группе крыс без СД 2 типа

Примечание – * – $p < 0,01$ в каждой временной точке.

После окончания высокожирового питания (на 8 неделе эксперимента) у крыс с СД 2 типа впервые зафиксирована статистически значимая разница в показателях массы тела ($305,9 \pm 21,9$ г) по сравнению с крысами без СД 2 типа ($268,2 \pm 19,3$ г), $p=0,02$. Кроме того, начиная с 10-й недели до окончания эксперимента у крыс группы СД 2, помимо показателей гликемии и массы тела, были также повышены уровни холестерина, триглицеридов сыворотки и индекс инсулинорезистентности (Таблица 1).

Таблица 1 – Изменения основных метаболических показателей на протяжении эксперимента у крыс с СД 2 типа и в контрольной группе

Оцениваемый показатель	Контроль без СД 2			Группа СД 2		
	10 недель	20 недель	30 недель	10 недель	20 недель	30 недель
Масса тела, г	$285,4 \pm 20,5$	$336,5 \pm 29,2$	$372,3 \pm 29,8$	$328,9 \pm 22,7^{**}$	$403,4 \pm 12,4^{***}$	$455,6 \pm 13,0^{**}$
HbA1c, %	$3,7 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,3^*$	$7,0 \pm 0,3^*$	$6,9 \pm 0,3^*$
Глюкоза плазмы крови натощак, ммоль/л	$3,7 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,4$	$9,7 \pm 2,6^{**}$	$9,2 \pm 2,1^{**}$	$9,3 \pm 2,2^*$
НОМА-IR	$1,9 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,4^*$	$2,9 \pm 0,2^*$	$2,9 \pm 0,7^*$
Общий холестерин, ммоль/л	$1,5 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,3^{**}$	$2,8 \pm 0,2^*$	$2,7 \pm 0,2^*$
Триглицериды, ммоль/л	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2^*$	$0,9 \pm 0,1^*$	$0,9 \pm 0,2^*$

Примечание – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ в сравнении с группой Контроль (без СД 2) в соответствующей временно точке.

С момента первичной оценки функции почек (на 10 неделе) к окончанию эксперимента у крыс группы СД 2 отмечалось повышение альбуминурии более чем в 40 раз (с уровня $52,1 \pm 17,6$ до $2263,8 \pm 394,5$ мкг/сутки, $p=0,002$) и близкое к двукратному снижению клиренса креатинина (с $1,57 \pm 0,37$ до $0,9 \pm 0,1$ мл/мин/кг, $p=0,02$). На 30-й неделе, по сравнению с контрольной группой, у крыс с СД 2 типа наблюдалось значимое повышение экскреции маркеров канальцевого повреждения NGAL ($1861,8 \pm 660,8$ нг/24 ч vs. $328,4 \pm 137,2$ нг/24 ч, $p < 0,001$) и KIM-1 ($6,3 \pm 1,8$ нг/24 ч vs. $1,1 \pm 0,4$ нг/24 ч, $p < 0,001$). Это сопровождалось значимым утолщением гломерулярной базальной мембраны, формированием тубулоинтерстициального фиброза и экспансией мезангиального матрикса с начальными признаками гломерулосклероза (однако, без признаков развития полного фиброза с окклюзией и узелков Киммельстилл-Уилсона) (Рисунок 2 (а), (б), (в), соответственно).

Таким образом, наблюдаемые в группе СД 2 морфофункциональные почечные изменения свидетельствовали о формировании ДН, соответствующей относительно ранним стадиям поражения почек у больных СД 2 типа.

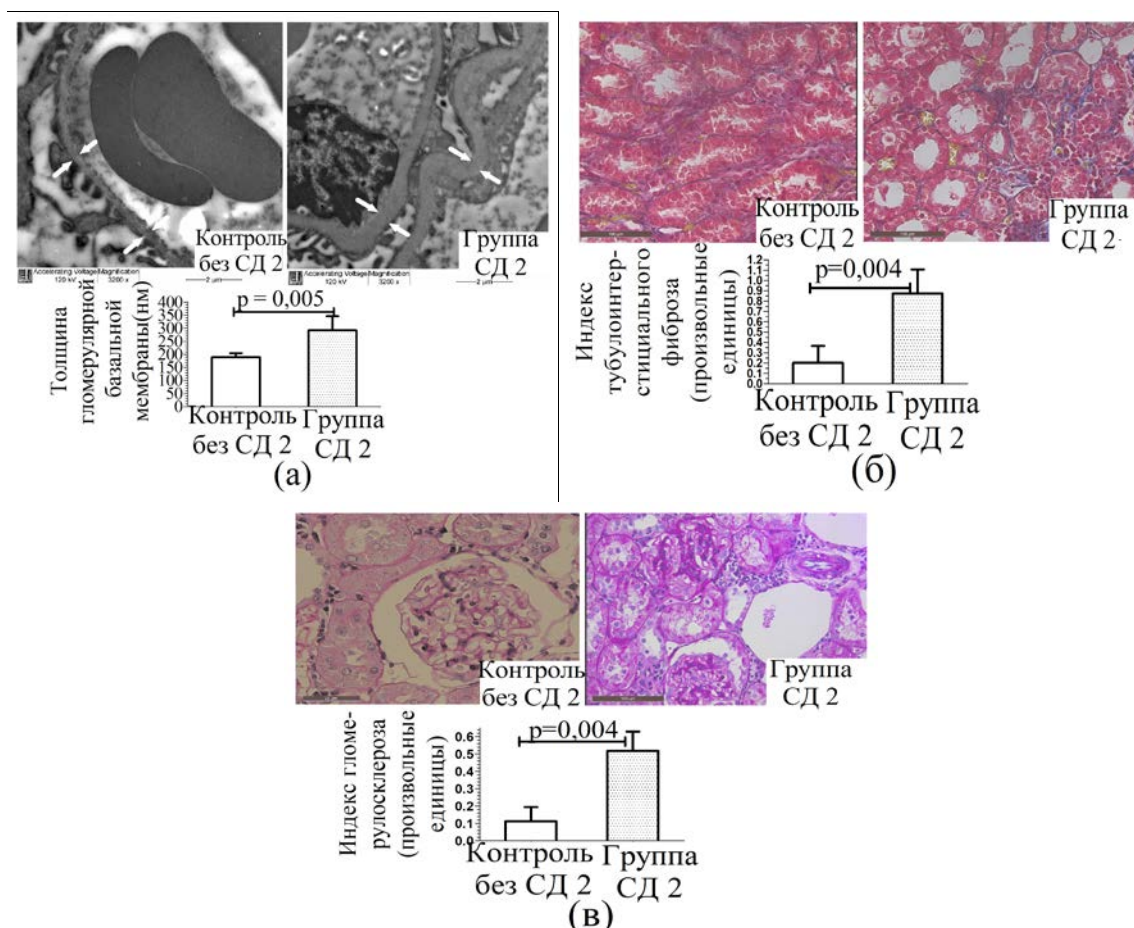


Рисунок 2 – Морфологические почечные изменения у крыс с экспериментальной ДН и крыс контрольной группы без СД 2 типа

Примечание – (а) Толщина гломерулярной базальной мембраны отмечена стрелками (электронная микроскопия, увеличение $\times 3600$). (б) Значения индекса тубулоинтерстициального фиброза (трихромное окрашивание по Массону, увеличение $\times 200$). (в) Значения индекса гломерулосклероза (окрашивание реактивом Шиффа, увеличение $\times 400$).

Сравнение влияния терапии метформином и вилдаглиптином на структурно-функциональное состояние почек крыс с СД 2 типа

Назначение крысам с СД 2 типа на 10 недель метформина или вилдаглиптина привело к незначимому снижению HbA1c в сравнении с контрольной группой СД 2 (Таблица 2). В группе СД 2 (вилдаглиптин) отмечались значимо более низкие уровни креатинина сыворотки, альбуминурии, толщины гломерулярной базальной мембраны и индекса экспансии мезангиального матрикса, а также более высокий клиренс креатинина по сравнению с контролем (СД 2) (Таблица 2). Назначение метформина, значимо не влияя на рутинные почечные маркеры и ультраструктурные изменения клубочков, по сравнению с отсутствием лечения, существенно уменьшало экскрецию маркеров повреждения канальцев NGAL и KIM-1 на фоне незначимого ослабления выраженности мезангиальной экспансии и тубулоинтерстициального фиброза (Таблица 2).

Таким образом, в эксперименте на крысах с СД 2 типа показана способность как вилдаглиптина, так и метформина ослаблять морфофункциональные проявления ДН, напрямую не связанные с их сахароснижающим действием.

Таблица 2 – Уровни HbA1c, почечных показателей и данные морфометрического анализа по окончании исследования в группах крыс с СД 2 типа и крыс без СД 2

Оцениваемый показатель	Контроль без СД 2 n = 10	СД 2 (контроль) n = 7	СД 2 (вилдаглиптин) n = 8	P ¹	СД 2 (метформин) n=8	P ²
HbA1c, %	4,0 ± 0,3	6,9 ± 0,3*	6,6 ± 0,5*	0,12	6,7 ± 0,7*	0,36
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	41,9 ± 4,1	69,0 ± 4,3*	58,0 ± 4,7*	0,003	63,8 ± 10,2*	0,3
Клиренс креатинина, мл/мин/кг	1,3 ± 0,4	0,9 ± 0,1*	1,1 ± 0,2	0,045	0,9 ± 0,1*	0,62
Альбумин мочи, мкг/24 ч	71,4 ± 26,4	2263,8 ± 394,5**	1262,9 ± 311,6**	0,003	1743,5 ± 476,5**	0,13
KIM-1, нг/24 ч	1,1 ± 0,4	6,3 ± 1,8**	4,8 ± 0,8**	0,07	3,5 ± 1,2**	0,003
NGAL, нг/24 ч	328,4 ± 137,2	1861,8 ± 660,8**	1602,5 ± 572,6**	0,28	1319,7 ± 213,1**	0,03
Индекс мезангиальной экспансии, произвольные единицы	0,37 ± 0,09	2,0 ± 0,17**	1,41 ± 0,19*	0,008	1,63 ± 0,27*	0,06
Индекс тубулоинтерстициального фиброза, произвольные единицы	0,20 ± 0,16	0,88 ± 0,23**	0,90 ± 0,16**	0,03	0,73 ± 0,33 *	0,52
Толщина гломерулярной базальной мембраны, нм	189,7 ± 14,8	292,1 ± 54,1**	251,7 ± 23,9*	0,03	258,8 ± 32,6*	0,22
Примечание – P ¹ – СД 2 (вилдаглиптин) vs. СД 2 (контроль). P ² – СД 2 (метформин) vs. СД 2 (контроль). * – p < 0,05, ** – p < 0,001 в сравнении с группой контроль без СД 2.						

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение экскреции NGAL, L-FABP и коллагена IV типа у больных СД 2 типа и лиц без СД 2 типа в зависимости от градации альбуминурии и СКФ

Лабораторные исследования были выполнены у 81 мужчины и женщины из 84 включённых больных СД 2 типа. На основании уровня экскреции альбумина больные СД 2 типа были разделены на 2 подгруппы: с уровнем альбумин-креатининового соотношения (АКС) < 30 мг/г Кр. (группа СД 2 без ДН) и с умеренно повышенной альбуминурией (АКС 30-300 мг/г Кр.) – группа СД 2 (ДН). В Таблице 3 представлена их характеристика в сравнении с участниками контрольной группы без СД 2 типа. У больных СД 2 типа даже при АКС < 30 мг/г Кр. в сравнении с контрольной группой значимо повышался уровень L-FABP/Кр. и NGAL/Кр. в моче. Экскреция L-FABP/Кр., NGAL/Кр. и коллагена IV/Кр. у пациентов при умеренном повышении альбуминурии (ХБП А2) была в среднем в 2 раза выше, чем в группе СД 2 (без ДН).

Таблица 3 – Характеристика больных СД 2 типа в зависимости от категории альбуминурии в сравнении с контрольной группой без СД 2 типа

Показатель	Контрольная группа, n=26	Группа СД 2 (без ДН), АКС <30 мг/г Кр., n=40	Группа СД 2 (ДН), АКС 30-300 мг/г Кр., n=41	p для всех групп	p для всех групп с СД 2
Возраст (годы)	59,1±5,7	60,0±5,7	62,3±5,0	0,05	0,06
Мужской пол, n (%)	10 (38,5%)	14 (35,0%)	20 (48,8%)	0,43	0,21
Продолжительность СД 2 типа (анамнестически), годы	-	8,7±4,0	12,6±4,1	-	<0,001
HbA1c, %	5,38±0,42	7,0±0,5*	7,3±0,5*	<0,001	0,04
Систолическое АД, мм рт. ст.	136,5±10,8	131,9±8,5	135,6±9,6	0,12	0,09
Диастолическое АД, мм рт. ст.	81,4±7,9	79,2±7,1	82,2±7,3	0,16	0,06
рСКФкр, мл/мин/1,73м ²	88,1±10,7	80,4±13,2*	73,4±13,4**	<0,001	0,02
рСКФцис, мл/мин/1,73 м ²	101,5±8,3	93,0±14,5*	83,4±14,3**	<0,001	0,004
рСКФкр-цис, мл/мин/1,73 м ²	95,9±8,5	84,4±18,8*	76,6±16,9**	<0,001	0,08
АКС, мг/г Кр. Медиана [25%; 75%]	7,6±5,5 6,0 [4,3;9,2]	17,3±8,9 18,4 [10,3;25,6]	109,7±89,9** 62,2 [46,0;173,0]	<0,001	<0,001
Коллаген IV типа/Кр. мочи, мкг/г Кр., Медиана [25 %; 75%]	2,2±1,8 1,8 [1,0; 2,8]	3,3±2,2 2,7 [1,7; 4,4]	6,4±4,2** 5,5 [3,2; 9,0]	<0,001	<0,001
NGAL/Кр. мочи, мкг/г Кр. Медиана [25 %; 75%]	8,8±8,9 5,9 [2,0;13,4]	17,4±19,3* 13,3 [8,5; 20,5]	30,4±26,4** 23,2 [11,6; 43,2]	<0,001	0,01
L-FABP/Кр. мочи, мкг/г Кр. Медиана [25 %; 75%]	1,7±1,7 1,1 [0,7; 2,1]	2,4±1,4* 2,0 [1,4; 3,6]	5,4±5,8** 4,1 [2,5; 5,4]	<0,001	0,002
Приём ингибиторов АПФ/ БРА, n (%)	9 (34,6%)	28 (70,0%)*	33 (80,5%)*	<0,001	0,28
Анамнез сердечно-сосудистых заболеваний, n (%)	12 (46,2%)	16 (40,0%)	27 (65,9%)	0,06	0,02
Примечание – * – p<0,05,**– p<0,01 при сравнении с группой СД 2 (контроль); значения p≥0,05 при попарном сравнении не указаны. - - не оценивалось/оценка невозможна					

На основании уровня рСКФкр здоровые добровольцы и больные СД 2 типа были разделены на 2 подгруппы: с незначительным снижением рСКФкр (60-89 мл/мин/1,73 м²) и с рСКФкр в оптимальном диапазоне (≥90 мл/мин/1,73м²). С учётом большого разброса полученных значений изучаемых маркеров проводилось их логарифмирование (Рисунок 3). В оптимальном диапазоне рСКФкр пациенты с СД 2 типа характеризовались значимо более высокой экскрецией L-FABP/Кр. и NGAL/Кр. по сравнению с участниками контрольной группы без СД 2 типа.

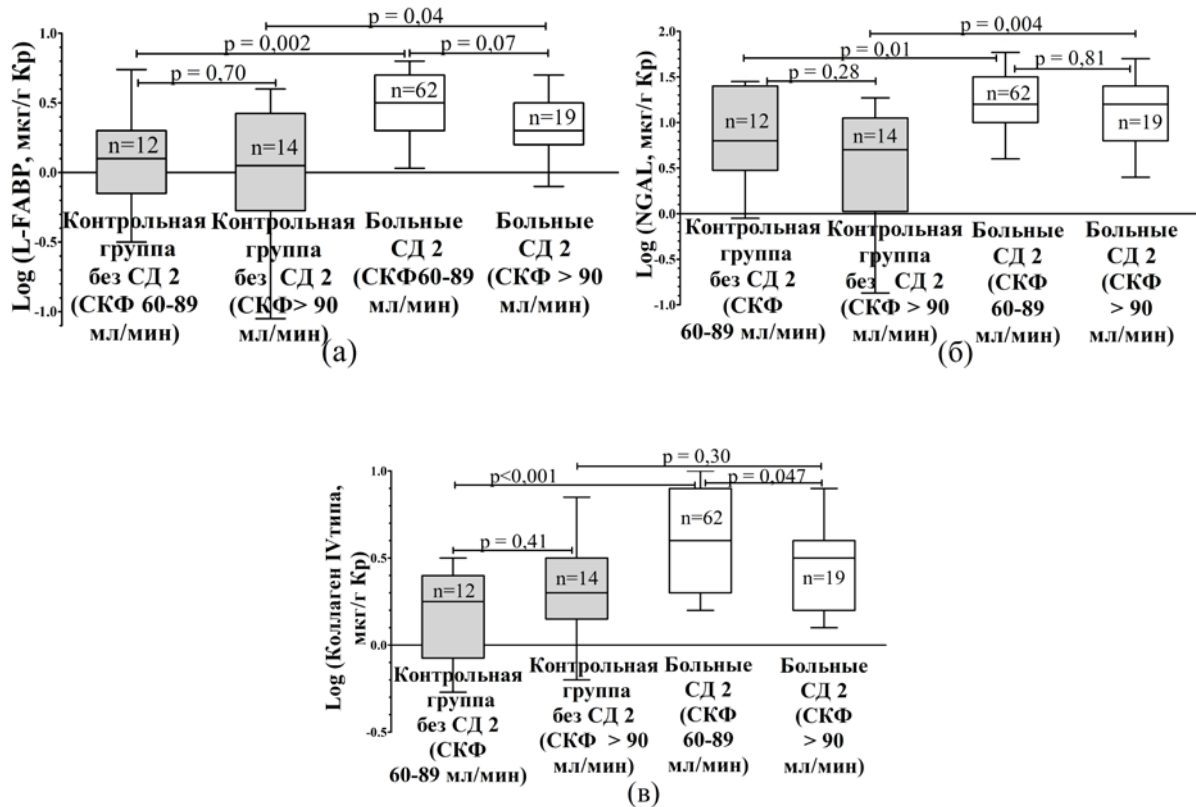


Рисунок 3 – Сравнение логарифмов уровня L-FABP/Кр. (а), NGAL/Кр. (б) и коллагена IV/Кр. (в) в контрольной группе и у больных СД 2 типа при нормальной СКФ и при незначительном её снижении

Взаимосвязь уровня изучаемых биомаркеров повреждения почек с классическими маркерами хронической болезни почек у больных сахарным диабетом 2 типа

Согласно данным регрессионного анализа, с рСКФкр положительно коррелировал уровень L-FABP/Кр. ($R=-0,33$, $p=0,006$) и коллагена IV/Кр. ($R=-0,27$, $p=0,01$). Величина экскреции L-FABP/Кр. и NGAL/Кр. практически не была связана с уровнем рСКФкр-цис ($R=-0,16$, $p=0,11$ и $R=-0,15$, $p=0,25$, соответственно). Величина экскреции L-FABP/Кр., NGAL/Кр. и коллагена IV/Кр. у больных СД 2 типа положительно коррелировала с выраженностью альбуминурии ($R=0,56$, $p<0,001$; $R=0,37$, $p=0,001$; $R=0,62$, $p<0,001$, соответственно), а отрицательно – с рСКФ по цистатину С ($R=-0,30$, $p=0,007$; $R=-0,35$, $p=0,001$; $R=-0,45$, $p<0,001$, соответственно). Линейный и множественный регрессионный анализ продемонстрировал сохранение значимой прямой зависимости от величины АКС уровня экскреции всех трёх мочевых маркеров даже после корректировки по полу, возрасту, градации рСКФкр и учёта терапии иАПФ/БРА ($p<0,001$ для всех ассоциаций), а также сохранение зависимости степени снижения рСКФцис от выраженности экскреции NGAL/Кр. независимо от величины АКС ($\beta=-0,29$, 95% доверительный интервал $[-0,33;-0,04]$, $p=0,001$).

Метаболические и почечные эффекты добавления на 6 месяцев метформина или вилдаглиптина больным сахарным диабетом 2 типа на инсулинотерапии

Из 70 больных СД 2 типа, включённых в проспективное рандомизированное

6-месячное исследование из числа участников одномоментного поперечного, 66 его завершили: 21 – в контрольной группе продолжения инсулинотерапии (группа И); 23 – в группе добавления вилдаглиптина (И+В); 22 – в группе добавления метформина (И+М). Группы были сопоставимы по основным сравниваемым параметрам (Таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика больных СД 2 типа в группах продолжения инсулинотерапии или добавления к ней вилдаглиптина или метформина

Показатель	Группа И, n=21	Группа И+В, n=23	Группа И+М, n=22	p для всех групп
Возраст (годы)	60,1±6,1	60,8±5,2	60,1±6,0	0,89
Мужской пол, n (%)	9 (42,9%)	9 (39,1%)	10 (45,5%)	0,91
Продолжительность СД 2, годы	10,5±4,84	9,7±3,6	9,1±3,9	0,75
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	6,9±1,5	6,9±0,5	6,5±1,1	0,14
Глюкоза крови после еды, ммоль/л	8,8±1,6	8,4±1,0	8,2±1,6	0,40
HbA1c, %	7,2±0,6	7,2±0,4	7,0±0,5	0,30
Доза инсулина, единиц/кг/сутки	0,47±0,15	0,46±0,12	0,49±0,13	0,75
Частота гипогликемических эпизодов (случаев в месяц)	1,3± 1,1	1,2±0,8	1,1± 1,0	0,76
ИМТ, кг/м ²	31,6±4,3	32,1±2,4	32,0±3,1	0,85
Общий холестерин, ммоль/л	5,5±0,9	5,4±0,9	5,5±0,8	0,94
Триглицериды, ммоль/л	1,5±0,49	1,5±0,4	1,7±0,6	0,94
Диастолическое АД, мм рт. ст.	131,3±10,9	132,9±9,0	132,7±7,6	0,82
Систолическое АД, мм рт. ст.	78,6±7,4	80,4±6,4	79,9±6,4	0,66
Антигипертензивная терапия, n (%)	17 (81,0 %)	20 (86,9 %)	20 (90,9 %)	0,92
Приём иАПФ/БРА, n (%)	16 (76,2%)	19 (82,6%)	14 (63,6%)	0,34
Гиполипидемическая терапия, n(%)	11 (52,4%)	15 (65,2%)	9 (41,0%)	0,64
Сердечно-сосудистые заболевания, n (%)	11 (52,4%)	11 (47,8%)	10 (45,5%)	0,89
Курение, n (%)	7 (33,3%)	6 (26,1%)	5 (22,7%)	0,73
Диабетическая полинейропатия, n (%)	17 (81,0%)	19 (82,6%)	17 (77,3%)	0,81
Диабетическая ретинопатия, n(%)	10 (47,6%)	9 (39,1%)	8 (36,4%)	0,74
ДН, ХБП категория А 2, n (%)	12 (57,1%)	14 (60,9%)	11 (50,0%)	0,74

За 6 месяцев в контрольной группе терапии инсулином не произошло существенного изменения оцениваемых метаболических показателей и АД (Рисунок 4). В обеих группах назначения ССП за 6 месяцев произошло сопоставимое улучшение гликемического контроля (снижение тощачковой и постпрандиальной гликемии, HbA1c, суточной дозы инсулина), а также показателей липидограммы (Рисунок 4). Терапия вилдаглиптином способствовала значимому снижению частоты гипогликемических эпизодов (медиана относительного снижения с межквартильным размахом – 50,0% [-75,5; -12,5]), а также снижению диастолического АД на 4,0 мм рт. ст. [-6,0; -3,0], $p < 0,01$ для обоих показателей при сравнении конечных значений с исходными и в сравнении с динамикой в двух других группах. Только терапия метформином сопровождалась снижением ИМТ (-0,6 кг/м² [-1,1; -0,13], $p < 0,001$).

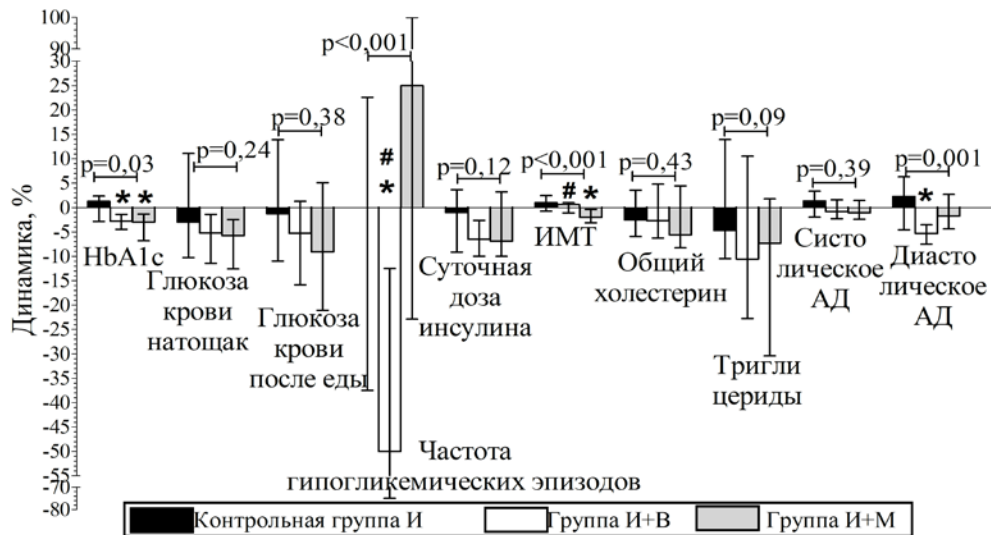


Рисунок 4 – Сравнение процентного изменения показателей гликемического контроля, метаболического статуса и АД за 6 месяцев наблюдения в группах больных СД 2 типа
 Примечание – Здесь и далее на Рисунке 5 показана медиана (высота столбиков) значений относительной динамики показателя и межквартильный размах. p – результаты сравнения динамики показателя одновременно во всех группах. Результаты попарного сравнения: * – $p<0,05$ versus группа И; # – $p<0,05$ versus группа И+М, значения $p\geq 0,05$ при этом не указаны.

Показатели почечной функции и маркеры повреждения почек, за исключением уровня цистатина С сыворотки, до начала исследования значимо не различались в сравниваемых группах больных СД 2 типа. За 6 месяцев все эти показатели значимо не изменились в контрольной группе продолжения инсулинотерапии (Таблица 5). На фоне добавления вилдаглиптина, помимо снижения уровня цистатина С, произошло значимое повышение рСКФцис (на 7,0% [3,7; 13,3]) и рСКФкр-цис (на 5,1% [1,4; 8,5]), сопровождавшееся уменьшением экскреции маркера клубочкового фиброгенеза коллагена IV/Кр. (на 32,8 % [-55,8; -24,4]), $p<0,001$ для каждого по сравнению с исходными уровнями (Таблица 5). Уменьшение экскреции коллагена IV/Кр. разной степени выраженности было зарегистрировано практически у каждого пациента (86,9%) группы И+В. В ней же близким к значимому оказалось снижение АКС (на 12,2% [-25,9%; 36,6], $p=0,14$), которое было зарегистрировано у 65,2% участников. Повышение СКФ на фоне 6-месячного добавления вилдаглиптина требует оценки долгосрочных эффектов (Т.Мoriya et al., 2017).

На фоне терапии метформином традиционные маркеры ХБП значимо не менялись (Таблица 5), однако выявлено умеренное снижение рСКФкр-цис (на 1,9 мл/мин/1,73 м² [-3,3; 1,1], $p=0,02$), что может быть связано с механизмом действия метформина как активатора АМФК и может являться защитным механизмом, сохраняющим функцию органа в долгосрочной перспективе (В. Viollet et al., 2012; М. J. Lee et al., 2007; Т. Moriya et al., 2017). Это сопровождалось существенным уменьшением экскреции маркеров канальцевого повреждения L-FABP и NGAL (Таблица 5). При сравнении уровней почечных маркеров в начале и по окончании исследования одновременно в 3 группах в

однофакторном дисперсионном анализе с повторными измерениями, значимым оказалось только снижение уровня цистатина С сыворотки в группе И+В ($p=0,04$).

Таблица 5 – Показатели почечной функции и маркеры повреждения почек в группах больных СД 2 типа в начале и по окончании проспективного исследования

Показатель	Группа И, n=21		Группа И+В, n=23		Группа И+М, n=22	
	0 месяцев	6 месяцев	0 месяцев	6 месяцев	0 месяцев	6 месяцев
Креатинин сыв., мкмоль/л	81,9±10,0	82,4±12,6	82,7±13,6	81,4±14,8	82,4±13,4	84,3±13,8
рСКФкр, мл/мин/1,73м ²	76,4±13,5	77,5±12,8	76,0±15,5	77,2±15,6	75,4±13,3	75,4±13,3
Цистатин С сыворотки, мг/л	0,94±0,15	0,89±0,14	0,84±0,11#	0,76±0,10**	0,85±0,12	0,88±0,14
рСКФцис, мл/мин/1,73м ²	87,3±16,7	88,4±16,9	92,9±13,9	100,7±11,6**	90,1±14,5	90,1±14,5
рСКФкр-цис, мл/мин/1,73м ²	81,5±13,1	81,5±14,1	84,7±14,1	89,5±13,6**	85,0±11,3	82,7±11,7*
АКС, мг/г Кр.	26,7 [20,1;70,]	27,2 [12,7;89,1]	28,6 [15,0;61,4]	24,0 [16,4;47,3]	26,7 [13,2;54,1]	20,1 [11,4;60,5]
Коллаген IV типа, мкг/г Кр.	3,8 [2,4; 7,2]	4,3 [2,5; 6,0]	3,3 [1,7; 6,9]	1,7 [1,4;4,1]**	2,6 [1,5; 6,5]	2,6 [1,6;4,6]
L-FABP, мкг/г Кр.	2,4 [1,8; 4,0]	2,9 [1,7; 4,2]	2,6 [1,4; 4,3]	2,0 [1,3;4,5]	2,8 [1,6; 4,3]	1,4 [1,0;2,6]**
NGAL, мкг/г Кр.	14,0 [5,3;24,2]	16,6 [6,8;28,0]	19,6 [8,6; 38,8]	15,7 [8,1;38,3]	13,8 [9,5; 24,7]	5,5 [3,7;14,1]**

Примечание – # – $p<0,05$ versus группа И и группа И+М (в начале исследования). * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$ при сравнении показателей внутри группы в начале и по окончании исследования.

Было проведено сравнение относительной динамики (в процентах) уровней маркеров одновременно в 3 группах (Рисунок 5).

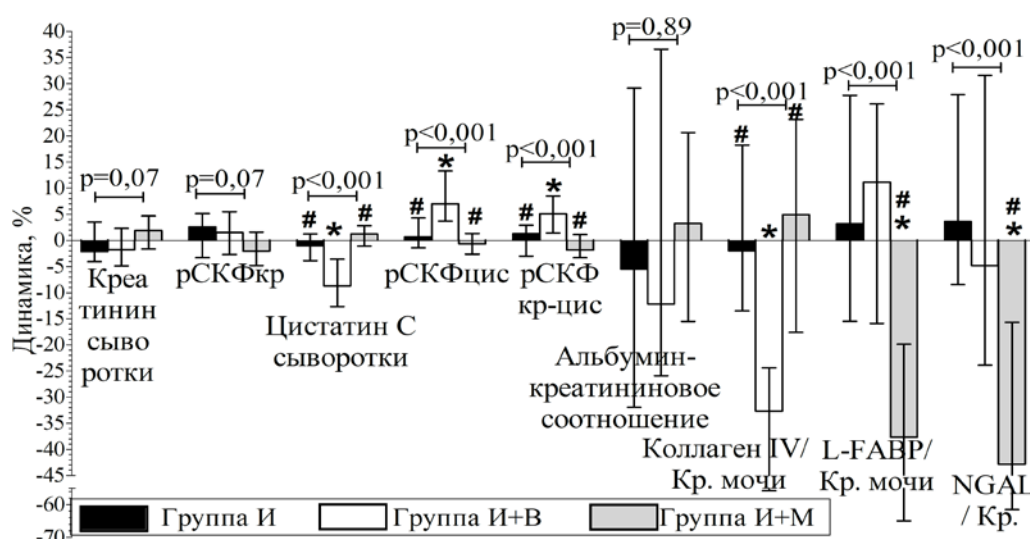


Рисунок 5 – Сравнение процентного изменения почечных показателей за 6 месяцев наблюдения в исследуемых группах больных СД 2 типа

Примечание – Результаты попарного сравнения: * – $p<0,05$ versus группа И; # – $p<0,05$ versus группа И+В, значения $p\geq 0,05$ при этом не указаны.

Снижение экскреции коллагена IV/Кр. и повышение уровня рСКФцис и рСКФкр-цис было значимым как при сравнении с контрольной группой, так и с группой И+М (Рисунок 5). Уменьшение экскреции маркеров канальцевого повреждения L-FABP/Кр. и NGAL/Кр. на фоне добавления метформина также было значимым в сравнении с динамикой этих показателей в двух других группах больных СД 2 типа (Рисунок 5).

В пошаговом регрессионном анализе было установлено, что сопутствующая сердечно-сосудистая патология, приём иАПФ/БРА и гиполипидемических препаратов не оказывали значимого влияния на реализацию выявленных почечных эффектов метформина и вилдаглиптина. Корреляционный анализ не выявил значимых ассоциаций изменения почечных маркеров в группе И+В с улучшением показателей гликемического контроля, что доказывает плейотропный характер воздействия вилдаглиптина на оцененные маркеры. В группе И+М уменьшение экскреции L-FABP/Кр. напрямую было ассоциировано со снижением ИМТ ($R=0,46$, $p=0,03$). Согласно результатам пошагового регрессионного анализа, наименее эффективно снижение экскреции NGAL/Кр. в группе И+М происходило при увеличении частоты гипогликемических эпизодов ($\beta=0,43$, $R^2=0,19$, $p=0,045$), и наоборот.

Выводы

1. Никотинамид-стрептозотоциновый диабет у крыс в сочетании с односторонней нефрэктомией и высокожировым питанием приводил к формированию характерных для сахарного диабета 2 типа метаболических нарушений, а также морфофункциональных изменений клубочков и канальцев, наблюдаемых при диабетической нефропатии.
2. Экскреция маркеров канальцевого повреждения NGAL и KIM-1 у крыс с сахарным диабетом 2 типа, получавших метформин в течение 10 недель, была значимо меньше, чем у животных с сахарным диабетом 2 типа без лечения. У крыс, получавших вилдаглиптин, отмечался более высокий клиренс креатинина, значимое уменьшение альбуминурии, а также ультраструктурных и гистологических признаков диабетической нефропатии.
3. У больных сахарным диабетом 2 типа, по сравнению с участниками исследования без диабета, экскреция NGAL и L-FABP была увеличена даже при скорости клубочковой фильтрации >90 мл/мин/1,73м² и экскреции альбумина <30 мг/г креатинина.
4. У больных сахарным диабетом 2 типа величина экскреции NGAL, L-FABP и коллагена IV типа прямо коррелировала с выраженностью альбуминурии и со степенью снижения скорости клубочковой фильтрации, рассчитанной по цистатину С.
5. У больных сахарным диабетом 2 типа, получающих терапию инсулином, с близкими к целевым показателями гликемии добавление вилдаглиптина (50 мг/сутки) на 6 месяцев улучшало гликемический контроль и приводило к уменьшению экскреции коллагена IV типа с увеличением скорости клубочковой фильтрации, рассчитанной с использованием цистатина С.
6. У больных сахарным диабетом 2 типа, получающих терапию инсулином, добавление метформина (1500 мг в сутки) улучшало гликемический контроль и приводило к

значимому уменьшению экскреции маркеров повреждения канальцев L-FABP и NGAL.

Практические рекомендации

Предложенная модель диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа у крыс может быть использована для изучения влияния лекарственных препаратов на морфофункциональное состояние почек.

С целью дополнительной диагностики почечной дисфункции можно рекомендовать определение у больных сахарным диабетом 2 типа без хронической болезни почек уровня экскреции маркеров канальцевого повреждения NGAL и L-FABP. Коллаген IV типа не рекомендуется для ранней доальбуминурической диагностики.

Выявленные в клинико-экспериментальном исследовании нефропротективные эффекты метформина в отношении канальцевого повреждения и способность вилдаглиптина ослаблять повреждения клубочков при сахарном диабете 2 типа создают предпосылки для проведения более крупных рандомизированных клинических исследований, в том числе с оценкой влияния комбинации этих препаратов.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Bayrasheva, V. **Uninephrectomized high-fat-fed nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats: a model for the investigation of diabetic nephropathy in type 2 diabetes** [Electronic resource] / V.Bayrasheva, A.Babenko, V.Dobronravov [et al.] // *Journal of Diabetes Research*. 2016 – Vol. 2016. – P. 8317850. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/8317850/>
2. Байрашева, В.К. Роль метформина в профилактике диабетической нефропатии при экспериментальном сахарном диабете 2 типа / В.К.Байрашева, А.Ю.Бабенко, Ю.В.Дмитриев [и др.] // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2016. – Т. 15, № 3(59). – С. 70-80.
3. Байрашева, В. К. Новая модель сахарного диабета 2 типа и диабетической нефропатии у крыс / В.К.Байрашева, А.Ю.Бабенко, Ю.В.Дмитриев [и др.] // *Трансляционная медицина*. – 2016. – № 3(4). – С. 44-55.
4. Байрашева, В.К. Моделирование сахарного диабета и диабетической нефропатии в эксперименте [Электронный ресурс] / В.К.Байрашева // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 4. – С. 460(11). – Режим доступа: URL. – www.science-education.ru/127-21024.
5. Байрашева, В.К. Диабетическая нефропатия: зависит ли ренопротекция от выбора сахароснижающей терапии? / А.Ю.Бабенко, В.К.Байрашева // *Медицинский совет*. –2015. - № 7: 32-43.
6. Байрашева, В.К. Нефропротективные свойства ингибитора ДПП-4 в условиях экспериментальной диабетической нефропатии [Электронный ресурс] / В.К.Байрашева, А.Ю.Бабенко, Ю.В.Дмитриев [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 3. – С. 247(8). – Режим доступа: URL. – www.science-education.ru/123-20212. DOI: 10.17513/spno.123-20212.

7. Байрашева, В.К. Влияние метформина на функцию почек у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа на инсулинотерапии / В.К.Байрашева, А.Ю.Бабенко, И.Ю.Пчелин [и др.] // Русский медицинский журнал. – 2016. – № 20. – С. 1334-1339.
8. Байрашева, В.К. Перспективы нефропротекции при сахарном диабете 2-го типа с использованием ингибитора ДПП-4 вилдаглиптина / В.К.Байрашева, А.Ю.Бабенко, А.А.Байрамов [и др.] // Медицинский совет. – 2017. – № 3. – С. 8-16.
9. Bayrasheva, V. Novel urinary biomarkers for early detection of experimental diabetic nephropathy / V.Bayrasheva, A.Babenko, Y.U.Dmitriev [et al.] // European Heart Journal. – Vol. 37, Supplement 1, ESC 2016 Abstract book. – P.807.
10. Байрашева, В.К. Роль маркеров канальцевого повреждения в ранней диагностике диабетической болезни почек при сахарном диабете 2 типа / А.П.Алиев, В.К.Байрашева // Трансляционная медицина. – 2017. – Приложение № 1, Тезисы XI ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов. – С. 147.

Список сокращений

АД – артериальное давление

АКС – альбумин-креатининовое соотношение (моча)

АПФ – ангиотензин-превращающий фермент

БРА – блокаторы рецепторов ангиотензина-II

ДН – диабетическая нефропатия

ДПП-4 – дипептидил-пептидаза 4 типа

ИМТ – индекс массы тела

ИФА – иммуноферментный анализ

Коллаген IV/Кр. – соотношение коллагена IV типа к креатинину мочи

НА – никотинамид

рСКФкр – расчётная скорость клубочковой фильтрации по креатинину

рСКФкр-цис – расчётная скорость клубочковой фильтрации по креатинину и цистатину С сыворотки

рСКФцис – расчётная скорость клубочковой фильтрации по цистатину С

СД – сахарный диабет

СД 2 – обозначение сахарного диабета 2 типа в названиях групп

ССП – сахароснижающий препарат (ты)

СТЗ – стрептозотоцин

ХБП – хроническая болезнь почек

СКД-EPI – сотрудничество в области эпидемиологии хронических заболеваний почек (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)

HbA1c – гликированный гемоглобин

НОМА-IR – гомеостатическая модель оценки инсулинорезистентности

КИМ-1/Кр. – соотношение уровня молекулы повреждения почек-1 к креатинину мочи

L-FABP/Кр. – соотношение уровня печеночной формы белка, связывающего жирные кислоты, к креатинину

NGAL/Кр. – соотношение уровня ассоциированного с нейтрофильной желатиназой липокалина к креатинину мочи