

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Гринева Елена Николаевна

доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант:

Галагудза Михаил Михайлович

доктор медицинских наук,

член-корреспондент РАН

Санкт-Петербург – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
 ГЛАВА 1.	
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Диабетическая нефропатия при сахарном диабете 2 типа: эпидемиологические аспекты, патогенез и факторы риска.....	15
1.2 Критерии диагностики диабетической нефропатии.....	18
1.2.1 Морфологические критерии диабетической нефропатии.....	19
1.2.2 Рутинные лабораторные показатели диагностики диабетической нефропатии.....	20
1.2.3 Новые сывороточные и мочевые маркеры поражения почек при сахарном диабете 2 типа.....	23
1.3 Современное представление о плеiotропных эффектах сахароснижающих препаратов на почки.....	28
1.3.1 Эффекты применения метформина на почки при сахарном диабете.....	30
1.3.2 Эффекты применения вилдаглиптина на почки при сахарном диабете.....	35
1.4 Способы экспериментального моделирования диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа.....	39
1.4.1 Критерии экспериментального сахарного диабета 2 типа.....	39
1.4.2 Лабораторные и морфологические критерии валидации модели диабетической нефропатии у грызунов.....	40
1.4.3 Описанные экспериментальные модели диабетической нефропатии у крыс.....	40
 ГЛАВА 2.	
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	44
2.1 Материалы и методы экспериментальной части исследования.....	44
2.1.1 Объект исследования и структура эксперимента.....	44

2.1.2 Методы лабораторного подтверждения сахарного диабета 2 типа и диабетической нефропатии.....	46
2.1.3 Методы морфологического подтверждения почечных диабетических изменений и морфометрического анализа.....	48
2.2 Материалы и методы клинической части исследования.....	51
2.2.1 Общая характеристика обследованных участников и дизайн исследования.....	52
2.2.2 Клинические методы обследования.....	54
2.2.3 Инструментальные методы обследования.....	55
2.2.4 Лабораторные методы обследования.....	56
2.3 Статистическая обработка данных.....	58

### ГЛАВА 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	60
3.1 Модель экспериментальной диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа у крыс.....	60
3.1.1 Показатели гликемии и стабильность метаболических нарушений при развитии экспериментального сахарного диабета 2 типа у крыс.....	60
3.1.2 Лабораторные изменения, характеризующие развитие диабетической нефропатии у крыс.....	63
3.1.3 Морфологические изменения, характеризующие развитие диабетической нефропатии у крыс.....	65
3.2 Оценка влияния в хроническом эксперименте метформина и вилдаглиптина на структурно-функциональное состояние почек крыс с сахарным диабетом 2 типа.....	66
3.2.1 Показатели углеводного обмена и метаболические параметры в сравниваемых экспериментальных группах.....	66
3.2.2 Рутинные показатели и биомаркеры повреждения почек в сравниваемых экспериментальных группах.....	67
3.2.3 Морфологические почечные изменения в сравниваемых	

экспериментальных группах.....	70
3.3 Заключение к Главе 3.....	73
ГЛАВА 4.	
РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	74
4.1 Сравнение экскреции маркеров повреждения почек у больных сахарным диабетом 2 типа и лиц без диабета, взаимосвязь с альбуминурией и расчётной скоростью клубочковой фильтрации.....	74
4.1.1 Характеристика обследованных больных сахарным диабетом 2 типа и участников контрольной группы без диабета.....	74
4.1.2 Характеристика обследованных больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от категории альбуминурии.....	76
4.1.3 Показатели почечной функции в контрольной группе и у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от категории альбуминурии.....	79
4.1.4 Уровень маркеров повреждения почек в контрольной группе и у больных сахарным диабетом 2 типа при нормальной СКФ и при незначительном её снижении.....	81
4.1.5 Взаимосвязь уровня биомаркеров повреждения почек с классическими маркерами почечного поражения.....	83
4.2 Метаболические и почечные эффекты добавления метформина или вилдаглиптина на 6 месяцев больным сахарным диабетом 2 типа, получающим терапию инсулином.....	89
4.2.1 Характеристика обследованных больных сахарным диабетом 2 типа, включенных в проспективное исследование.....	89
4.2.2 Показатели почечной функции и маркеры повреждения почек у больных сахарным диабетом 2 типа, включенных в проспективное исследование.....	91
4.2.3 Изменение показателей гликемического контроля, метаболического статуса и АД за 6 месяцев в группах продолжения терапии инсулином или добавления к ней метформина или вилдаглиптина.....	93

4.2.4 Динамика показателей почечной функции и маркеров повреждения почек за 6 месяцев в группах продолжения терапии инсулином или добавления к ней метформина или вилдаглиптина.....	96
4.2.5 Оценка взаимосвязи динамики почечных показателей с изменением показателей компенсации сахарного диабета 2 типа в группах добавления к инсулинотерапии метформина или вилдаглиптина.....	102
4.3 Заключение к Главе 4.....	106
ГЛАВА 5.	
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	107
ВЫВОДЫ.....	122
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность и степень разработанности темы

Диабетическая нефропатия (ДН) является актуальной медико-социальной проблемой [19, 112]. Сахарный диабет (СД) 2 типа, в особенности осложнённый ДН, является одной из ведущих причин сердечно-сосудистых событий, развития терминальной стадии хронической болезни почек (ХБП) с потребностью в гемодиализе, инвалидизации и смертности [20, 42, 57, 71, 72, 112, 162].

Достижение стойкой компенсации углеводного обмена без увеличения частоты гипогликемических эпизодов, наряду с контролем артериального давления и липидного спектра, является необходимым условием профилактики развития и прогрессирования ДН [1, 34, 191]. Первостепенная роль в этом принадлежит правильному выбору оптимального сахароснижающего препарата (ССП), способного длительно поддерживать компенсацию СД 2 типа и по возможности благоприятно воздействовать на основные факторы риска поражения почек при СД 2 типа [41, 132]. С этой позиции перспективными представляются ССП, влияющие на баланс одного из классов кишечных гормонов – инкретинов, основным из которых является глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1) [8]. В последние годы стало известно, что ГПП-1 не только глюкозозависимо регулирует секрецию инсулина и глюкагона, но и напрямую способен стимулировать натрийурез и противовоспалительный потенциал почек [8, 16, 100]. Кроме того, фермент дипептидилпептидаза 4 типа (ДПП-4), участвующий в деградации инкретина ГПП-1, метаболизирует другие гормоноподобные субстанции с вазоактивными, иммуномодулирующими, натрийуретическими и антиоксидантными свойствами [8, 16, 118]. Всё это создаёт патофизиологические предпосылки для поиска потенциальных

нефропротективных свойств у препаратов, ингибирующих ДПП-4 [8, 16, 102, 118, 149].

Одним из ингибиторов ДПП-4, продемонстрировавших нефропротективный потенциал, является вилдаглиптин [16, 54, 75, 118, 207]. Несмотря на отсутствие убедительных клинических данных, вилдаглиптин у крыс с экспериментальным СД 1 типа и у крыс с генетическим дефектом в рецепторе лептина (линия Zucker Diabetic Fatty) замедлял развитие ДН за счёт уменьшения процессов воспаления и окислительного стресса в почечной ткани [54, 75, 207]. Однако низкая встречаемость мутации гена рецептора лептина в популяции [150] и невозможность воспроизведения в моделях СД 1 типа таких важных компонентов поражения почек при СД 2 типа, как избыточная масса тела, инсулинорезистентность и дислипидемия [178, 191], не позволяют экстраполировать эти данные на пациентов с СД 2 типа. При этом описанные на сегодняшний день негенетические модели ДН при СД 2 типа у грызунов не соответствуют всем критериям, необходимым для их полноценной валидации [178, 184].

Ещё одним ССП, противодиабетический эффект которого частично реализуется через влияние на баланс инкретинов, является метформин [26, 137]. Метформин способен благоприятно воздействовать на многие метаболические нарушения, характерные для СД 2 типа, чем в некоторой степени объясняются его позитивные сердечно-сосудистые эффекты [17, 81, 84, 122]. Несмотря на то, что эти же метаболические нарушения имеют важное значение в патогенезе ДН при СД 2 типа [32, 42, 77, 164, 191], данные о положительном влиянии метформина на почечную функцию не столь однозначны и в основном относятся к доклиническим исследованиям [111, 136, 160, 189]. Так, в ряде экспериментальных работ продемонстрирована способность препарата ослаблять процессы, связанные с повреждением канальцевого эпителия [155, 189]. Не исключено, что для выявления нефропротективного потенциала препарата недостаточно использовать рутинные маркеры повреждения почки. Учитывая ту значимую роль в патогенезе ДН, которую в последние годы стали отводить

канальцевым нарушениям [4, 5, 9, 40, 172, 204, 205], целесообразным представляется также оценка маркеров повреждения канальцев на фоне терапии метформином.

Известен ряд молекул, экспрессируемых эпителиоцитами канальцев (ассоциированный с нейтрофильной желатиназой липокалин (NGAL), печеночная форма белка, связывающая жирные кислоты (L-FABP), молекула повреждения почек-1 (KIM-1) и др.), мочевого экскреция которых отражает степень тубулоинтерстициального повреждения и фиброза [5, 110, 140, 144]. В настоящий момент в литературе обсуждается возможность применения оценки их экскреции для раннего выявления поражения почек при СД. Кроме того, в качестве кандидата на маркер доклинической диагностики ДН при СД 2 типа рассматривается коллаген IV типа, экскреция которого коррелирует со степенью выраженности гломерулосклеротических изменений [21, 37, 202]. В доступной литературе отсутствуют данные о влиянии терапии метформином и вилдаглиптином на перечисленные маркеры поражения канальцев и клубочков.

### **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.

Продемонстрировано, 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.

Продемонстрирована 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 видаглиптина и метформина не только улучшать компенсацию сахарного диабета 2 типа, но и оказывать плеiotропные 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 ХБП из числа сотрудников ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 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.

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 стрептозотоцина.

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.

### **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.

Результаты и выводы диссертационной работы 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 (акт о внедрении результатов НИР № 327) и включены в программу образовательного цикла по диабетологии «Мультидисциплинарный подход к ведению пациентов с сахарным диабетом 2 типа и коморбидной патологией», организованного Институтом медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России. 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.

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 XVIII конкурсе Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга «Молодые, дерзкие, перспективные» (2015, Санкт-Петербург); на круглом столе среди победителей конкурса Грантов Правительства Санкт-Петербурга для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, для аспирантов вузов, отраслевых и научных институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга (2014, Санкт-Петербург).

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.

### **Личный вклад диссертанта**

Участие автора в диссертационном исследовании выразилось в проведении обзора литературы по тематике работы, планировании исследования, наборе материала, 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.

Этический комитет ФГБУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А.Алмазова» Минздрава России (ныне ФГБУ «НМИЦ им. В.А.Алмазова» Минздрава России) 10.04.2013 г. заключил, что проведение настоящего исследования соответствует этическим нормам, принятым для данного типа исследований.

### **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.

## Глава 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1 Диабетическая нефропатия при сахарном диабете 2 типа: эпидемиологические аспекты, патогенез и факторы риска

Наблюдаемый в настоящее время неуклонный рост числа больных сахарным диабетом (СД) СД 2 типа неизбежно отразился на распространённости почечного микрососудистого осложнения заболевания – диабетической нефропатии (ДН) [42, 71, 112, 162]. ДН, трактуемая с 2007 г. как диабетическая болезнь почек, развивается у 20-50% больных СД 2 типа [19, 34, 42, 71, 72]. Согласно данным Государственного регистра сахарного диабета, в Российской Федерации распространённость ДН при СД 2 типа составляет в среднем около 30% [34].

ДН увеличивает заболеваемость, инвалидизацию и смертность пациентов с СД 2 типа, наравне с СД являясь самостоятельным фактором риска развития и прогрессирования сердечно-сосудистой патологии и одной из ведущих причин терминальной почечной недостаточности [22, 57, 71, 142, 192]. СД 2 типа увеличивает риск хронической болезни почек (ХБП) в 2,6 раза, а риск смерти из-за почечной патологии – в 3 раза [34, 71, 212].

В своём классическом течении ДН проходит прогрессию от стадии нормоальбуминурии через её нарастание вплоть до протеинурии и снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ) [42, 162]. Тем не менее, ассоциация степени повышения альбуминурии и снижения СКФ прослеживается не у всех пациентов. Так, у трети из них при уровне альбумин-креатининового соотношения (АКС)  $>30$  мг/г регистрируются несниженные значения клубочковой фильтрации [6, 42, 129, 162]. Кроме того, в 30% случаев постепенное снижение СКФ при СД 2 типа наблюдается на фоне нормальных значений альбуминурии [6, 145, 162].

Пусковым механизмом запуска повреждения почек при СД является гипергликемия, в связи с чем неадекватный гликемический контроль является ключевым фактором риска развития и прогрессирования ДН [42, 72, 77, 164, 191]. Крупные клинические исследования продемонстрировали не только ассоциацию нецелевого уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) с частотой развития ДН при СД 2 типа, но и снижение этого риска на фоне интенсивного гликемического контроля [53, 86, 115, 151, 163]. По мере прогрессирования почечной дисфункции значимость гипергликемии как ведущего фактора риска ДН уменьшается, при этом увеличивается значение гемодинамической составляющей [32, 42].

Известно, что при СД происходит повреждение всех видов почечных клеток. Исторически считалось, что при ДН первично повреждаются структуры клубочков нефрона с последующим вовлечением структур тубулоинтерстиция (формирование интерстициального фиброза, канальцевой атрофии и гипоксии), создающих почву для прогрессирования ДН [6, 40, 166, 204, 205, 211]. При этом формированию гломерулосклероза и снижению СКФ при СД 2 типа, помимо подоцитопении, клубочковой гиперfiltrации и ишемических сосудистых изменений, способствуют также нарушения в мезангиальных клетках (их гипертрофия и экспансия мезангиальной матрикса) [117]. Однако в последние годы тубулоинтерстициальным нарушениям стала отводиться всё большая роль в качестве индукторов развития ДН [40, 140, 172, 204, 205].

Известно, что степень прогрессии ХБП больше коррелирует со степенью тубулоинтерстициального фиброза, а не с клубочковыми морфологическими изменениями [140]. Тубулоинтерстиций, состоящий из канальцевого эпителия, сосудистых структур и интерстиция, суммарно занимает более 90% объёма почечной ткани [172]. Канальцевый эпителий, будучи инсулин-независимым, является крайне чувствительным к воздействию гипергликемии [205]. За счёт тубулогломерулярной обратной связи изменения в транспорте глюкозы и натрия в почечных канальцах создают предпосылки для развития ключевого механизма возникновения и прогрессии ДН – внутриклубочковой гипертензии с гиперfiltrацией [6, 38, 42, 164, 191, 204, 205]. Современные исследования в



некоторых случаях подтверждают более быстрое снижение СКФ в случае изначально диагностированного состояния гиперфльтрации по сравнению с нормальными показателями СКФ [6, 62].

Высокая смертность при СД 2 типа отчасти обусловлена широким распространением среди пациентов метаболического синдрома и отдельных его компонентов, наравне с альбуминурией и снижением рСКФ являющихся установленными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и предикторами прогрессии ХБП [22, 32, 32, 42, 57, 62, 101, 164]. Так, дислипидемия выявляется у каждого второго пациента с СД 2 типа, около 90% больных имеют избыточную массу тела или ожирение [24, 101], повышение АД обнаруживается в 70-80% случаев [19]. Более 80% пациентов при этом имеют инсулинорезистентность, являющуюся ключевым механизмом запуска развивающихся метаболических нарушений [22, 31]. Ожирение, дислипидемия, инсулинорезистентность и повышение АД при СД 2 типа ассоциированы с дополнительным повышением риска ДН [24, 128, 163, 164, 191], а нормализация этих показателей уменьшает экскрецию альбумина и замедляет снижение СКФ [91].

Среди факторов риска ДН, усугубляющих прогрессию ДН при СД 2 типа, обсуждается вклад анемии. Выявлено, что анемия предсказывает неблагоприятные почечные исходы и нередко развивается гораздо раньше значимого снижения СКФ [25].

В настоящий момент в литературе обсуждается вклад гипогликемии в прогрессирование ДН. Так, в исследовании Lee Y.L. et al. (2015) было продемонстрировано, что тяжёлая гипогликемия является независимым фактором риска повышения креатинина крови и снижения рСКФ [181]. Гипогликемия сопровождается активацией симпатoadреналовой системы с повышением выброса катехоламинов, повышением активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), приводящих к значимому повышению АД, ЧСС, формированию эндотелиальной дисфункции и гиперкоагуляции [48]. Всё это не только ухудшает кровоток в почечной ткани, но и увеличивает риски сердечно-

сосудистых событий и смертности [35, 111]. Кроме того, у пациентов с ДН риск развития гипогликемий увеличивается по мере ухудшения почечной функции [48]. Продемонстрировано, что вариабельность гликемии, связанная с повышением постпрандиального уровня глюкозы, также ассоциирована со снижением СКФ и повышением риска развития ДН у больных СД с неудовлетворительным контролем гликемии ( $HbA1c \geq 7,0\%$ ) [15, 182].

В качестве факторов риска прогрессии ДН в литературе обсуждается роль окислительного стресса и субклинического воспаления, активирующихся под воздействием описанных выше метаболических и гемодинамических факторов [22, 28, 42, 191]. К известным немодифицируемым факторам риска ДН при СД 2 типа относят стаж диабета, пожилой возраст, мужской пол, наличие диабетической ретинопатии, этническую принадлежность и наследственную предрасположенность, а к модифицируемым – курение [38, 77, 96, 191]. В исследовании UKPDS факторами риска снижения СКФ являлись пожилой возраст и инсулинорезистентность. В то время как факторами риска нарастания альбуминурии были названы мужской пол, ожирение, гипергликемия и дислипидемия [164]. Наличие диабетической ретинопатии у большинства пациентов с ДН подтверждает системное поражение микрососудов при СД 2 типа [42].

## **1.2 Критерии диагностики диабетической нефропатии**

ДН представляет собой специфическое поражение капилляров, мезангиальных клеток и подоцитов клубочков, а также артериол и канальцев почек, возникающее в результате воздействия гипергликемии как иницирующего фактора, которое сопровождается формированием диффузного (на ранних стадиях) или узелкового (на поздних стадиях) гломерулосклероза,

приводящего к развитию терминальной почечной недостаточности, требующей проведения заместительной почечной терапии (диализ, трансплантация) [1, 42].

### **1.2.1 Морфологические критерии диабетической нефропатии**

Основными морфологическими изменениями, развивающимися при формировании ДН, являются выраженное утолщение базальной мембраны клубочковых капилляров, артериол, собирательных трубочек, экспансия мезангиального матрикса, а также тубулоинтерстициальный фиброз и артериологиперплазия [159, 172]. Обществом почечной патологии (Renal Pathology Society) в 2010 г. была предложена морфологическая классификация изменений почечной ткани при СД по результатам тонкоигольной биопсии, согласно которой ДН была поделена на 4 класса тяжести в зависимости от степени вовлечения в патологический процесс структур клубочков (толщина гломерулярной базальной мембраны (ГБМ), объем мезангия, диаметр просвета капилляров клубочков). Кроме того, поражение сосудов и интерстиция при ДН ранжируется в зависимости от присутствия и степени выраженности интерстициального фиброза и канальцевой атрофии, интерстициального воспаления, артериологиперплазии (для ДН специфично поражение выносящей артериолы) и артериосклероза [159].

В качестве методов окрашивания при световой микроскопии предложено использовать окраску гематоксилином и эозином, трихромное окрашивание по Массону, реакции с реактивом Шиффа и метенамин-серебром для выделения базальных мембран тканей почки.

Важно отметить, что по данным разных авторов, признаки типичной диабетической гломерулопатии по результатам световой микроскопии обнаруживают только у 30-50% больных СД 2 типа с микроальбуминурией. При этом у 20-40% пациентов обнаруживаются выраженные тубулоинтерстициальные и/или сосудистые изменения при минимальных изменениях в клубочках почек,

связанные с гипертензией или с ассоциированным атеросклерозом [42, 172,174]. Это свидетельствует о важной роли клеток канальцевого эпителия и изменения тубулоинтерстиция в почечном ремоделировании при ДН [174, 205].

### **1.2.2 Рутинные лабораторные показатели диагностики диабетической нефропатии**

В клинической практике диагноз ДН ставится на основании наличия и определения степени повышения альбуминурии и/или снижения СКФ [1, 71, 212]. Использование этих маркеров в рутинной клинической практике связано с наличием структурно-функциональных корреляций между степенью их изменения и выраженностью почечного повреждения при ДН, оцененного по результатам биопсий и аутопсий [174]. В этой связи выполнение биопсии почечной ткани требуется только в том случае, когда имеется значимое несоответствие между стажем СД и выраженностью протеинурии/снижения СКФ, а также при появлении необъяснимой гематурии, когда возникают основания заподозрить у пациента недиабетический генез почечных нарушений [159].

**Альбуминурия** рассматривается как чувствительный маркер ХБП, фактор сердечно-сосудистого риска и первый клинический признак ДН [56, 71]. Многими исследованиями показана высокая корреляция между величиной альбуминурии за 24 часа и уровнем альбуминурии в разовой порции, нормализованном относительно креатинина мочи [119, 121]. В связи с этим определение АКС в утренней порции мочи, наряду с суточной экскрецией альбумина, вошло в международные и российские руководства в качестве инструмента для диагностики ДН [1, 23, 71, 119].

Согласно современной классификации, стадии ХБП в зависимости от уровня альбуминурии ранжируются на 3 категории: ХБП А 1 – АКС<30 мг/г креатинина

мочи (Кр.) (нормальная или незначительно повышенная); ХБП А 2 – АКС 30-300 мг/г Кр. (умеренно повышенная); ХБП А 3 >300 мг/г Кр. (значительно повышена) [1]. Корректная диагностика повышенной альбуминурии предполагает выявление её ненормального уровня как минимум в 2 из 3 анализах, выполненных в интервале от 3 до 6 месяцев при отсутствии мочевой инфекции [23, 119], поскольку у 30% пациентов возможно спонтанное снижение альбуминурии [162].

**Скорость клубочковой фильтрации (СКФ)** является вторым обязательным показателем, который оценивается у пациентов с целью уточнения наличия и стадии ХБП при ДН [1, 23, 71, 119]. Несмотря на то, что СКФ является маркером фильтрационной функции, её снижение происходит параллельно с нарушением других почечных функций. В зависимости от диапазона значений СКФ ХБП делится на 6 стадий – от С 1 (при высокой или оптимальной СКФ $\geq$ 90 мл/мин/1,73м<sup>2</sup>) до терминальной почечной недостаточности (при СКФ<15 мл/мин/1,73м<sup>2</sup>) – что указывает на имеющиеся существенные различия в отношении рисков и прогнозов заболевания [1, 23, 71, 119].

В связи с трудоёмкостью и дороговизной прямых клиренсовых методик точного измерения СКФ в клинической практике нашла широкое применение оценка СКФ с использованием маркера эндогенной фильтрации креатинина [6, 23]. Длительное время используемые в клинике проба Реберга-Тареева и расчёт СКФ по формуле Кокрофта-Голта в настоящий момент не рекомендованы к применению в связи с невысокой точностью [6, 23, 119]. Формула на основании сывороточного креатинина с указанием пола, возраста и расы, предложенная коллаборацией в области эпидемиологии хронических заболеваний почек (СКД-ЕРI), при ожидаемых значениях СКФ>60 мл/мин признана наиболее предпочтительной для расчёта СКФ [23, 119, 124]. Тем не менее, определение СКФ по уровню сывороточного креатинина (рСКФкр) имеет свои ограничения, связанные с относительной его инертностью при необходимости диагностики быстрого изменения клубочковой фильтрации [6, 68].

В 2012 г. была предложена формула для расчёта СКФ, в которой в качестве эндогенного маркера фильтрации используется сывороточный цистатин С [61].

Цистатин С является небольшим белком семейства цистатинов, который с относительно постоянной скоростью синтезируется всеми ядродержащими клетками и полностью фильтруется почками, практически не секретирясь канальцевым эпителием. В отличие от креатинина, уровень цистатина С в крови мало зависит от поло-возрастных, этнических и антропометрических характеристик [6, 37, 61, 124]. Расчёт СКФ по уровню цистатина С с использованием формулы СКД-ЕРІ (рСКФцис) является потенциальной альтернативой клиренсовым методикам [61]. рСКФцис более значимо ассоциирована со смертностью по сравнению с рСКФкр [103]. При отсутствии повышения альбуминурии Inker L.A. et al. (2012) продемонстрировали, что дополнительное определение рСКФ на основании цистатина С сыворотки позволяет выявить ХБП в тех случаях, когда рСКФкр находилась в пределах 60-74 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> [61]. Тем не менее, при сравнении с эталонными клиренсовыми методиками наибольшую точность обеспечивает расчёт СКФ на основании одновременного использования креатинина и цистатин С сыворотки (рСКФкр-цис) в сравнении с использованием этих маркеров по отдельности [61]. Кроме того, рСКФкр-цис имеет наименьшую суточную вариабельность [113].

Изменения в почечных структурах возникают гораздо раньше изменения уровня АКС и СКФ [4, 6, 18, 42, 205]. Так, значимое изменение рСКФкр происходит тогда, когда половина почечной паренхимы уже не функционирует [6, 68]. Появление же клинически значимой альбуминурии отражает наличие склеротических изменений не менее чем в ¼ клубочков почек [18]. Несмотря на то, что альбуминурия в клинической практике считается «золотым стандартом» в диагностике ДН и оценке сердечно-сосудистого риска, этот маркер имеет много ограничений, таких как невысокая чувствительность и значительная вариабельность, зависимость от уровня физической активности, постуральной нагрузки, характера питания, температуры тела и др. [6, 206]. Кроме того, повышение альбуминурии при СД 2 типа является неспецифичным и может являться проявлением сопутствующей АГ [42, 172, 174]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что АКС и рСКФ по креатинину не являются

универсальными ранними маркерами диагностики ДН. Повышение частоты неблагоприятных сердечно-сосудистых и почечных исходов, наблюдающееся у пациентов с «высоконормальными» значениями альбуминурии, лишь подтверждает заблаговременность запуска патологического процесса [11, 127]. В связи с этим в настоящее время небезуспешно ведутся исследования по поиску более ранних доклинических маркеров структурных почечных нарушений, повышающихся уже на нормоальбуминурической стадии ДН при нормальных значениях СКФ.

### **1.2.3 Новые сывороточные и мочевые маркеры поражения почек при сахарном диабете 2 типа**

В качестве потенциальных кандидатов для ранней диагностики ДН в настоящий момент рассматриваются ряд показателей в крови и моче, происхождение которых разнообразно. В зависимости от патогенетического процесса, вовлечённого в формирование и прогрессию ДН, потенциальные маркеры доклинической диагностики ДН можно разделить на:

- биомаркеры почечного повреждения;
- биомаркеры воспаления (цитокины, хемокины, ростовые факторы);
- биомаркеры окислительного стресса [193].

Некоторые из биомаркеров являются структурными элементами различных отделов нефрона [4, 18, 93, 193], такие как:

- подоцитурия, а также белки подоцитов нефрин и подокаликсин;
- компоненты гломерулярной базальной мембраны: коллаген и ламинин;
- сосудистый эндотелиальный фактор роста, выделяемый эндотелиоцитами;
- компоненты канальцевого эпителия, такие как NGAL, NAG, L-FABP и KIM-1.

Выделение перечисленных молекул в моче напрямую отражает процессы, которые происходят при повреждении отдельных почечных структур, следствием которых в конечном итоге являются появление протеинурии и снижение СКФ.

Протеомный анализ позволил уже при нормоальбуминурии идентифицировать в моче пациентов с СД молекулы, которые имеют не только клубочковое, но и канальцевое происхождение [18, 121]. Как совместное, так и раздельное их определение в моче не вызывает трудностей. Однако уровень этих маркеров не откалиброван, что не позволяет пока широко использовать их в реальной клинической практике.

Среди потенциальных ранних маркеров диагностики ДН особую ценность имеют те показатели, которые являются одновременно предикторами прогрессирования ДН, и уровень которых коррелирует со степенью морфологических почечных изменений. Среди таких потенциальных показателей в числе прочих в литературе обсуждаются маркер клубочкового повреждения и фиброобразования коллаген IV типа, а также показатели канальцевой дисфункции NGAL, L-FABP и KIM-1.

**Коллаген IV типа** относится к классу нефбриллярных (минорных) коллагенов. Коллаген IV типа выстилает базальную мембрану клубочков и канальцев и является структурным компонентом мезангия почечных клубочков [202]. Гипергликемия стимулирует его синтез и снижает его разрушение при формировании гликированной формы белка. Повышенная экспрессия коллагена IV типа в почках при СД ассоциирована с диффузным гломерулосклерозом [66]. В нескольких работах была показана корреляция величины экскреции коллагена IV типа со степенью мезангиальной экспансии и повреждения клубочков нефрона при СД [21, 202, 203]. Литературные данные, в которых оценивается экскреция коллагена IV типа при ранних почечных диабетических изменениях, являются противоречивыми. В ряде работ продемонстрировано, что у больных СД 2 типа даже при нормальных значениях АКС был выявлен значимо более высокий уровень экскреции этого белка [65, 154]. В исследованиях других авторов уровень экскреции коллагена IV начинал повышаться у больных СД 2 типа только на



стадии микроальбуминурии [194, 203]. В другом исследовании, выполненном Климонтовым В.В и соавт. (2015), также не было выявлено значимой разницы в экскреции коллагена IV типа при СД 2 типа в сравнении с группой здорового контроля, при этом повышение экскреции коллагена IV типа было связано с повышением экскреции альбумина с мочой [37]. Во многих работах была продемонстрирована отрицательная корреляция значений мочевого коллагена IV типа с рСКФ [37, 91, 146]. Тем не менее, базальный уровень экскреции коллагена IV типа не был ассоциирован с прогрессией ДН [91, 146].

**Ассоциированный с нейтрофильной желатиназой липокалин (neutrophil gelatinase-associated lipocalin/ NGAL/ липокалин 2)** – это небольшой белок из семейства липокалинов, который высвобождается из нейтрофилов и многих эпителиальных клеток, включая эпителиоциты канальцев почек, выполняя защитную функцию (бактерицидные свойства, регуляция воспаления и роста клеток) [5, 200]. Высвобождение его резко увеличивается при канальцевом повреждении любого генеза, что позволяет использовать определение его уровня в моче не только в диагностике острого почечного повреждения [5, 93, 146, 193]. Продемонстрировано увеличение экспрессии NGAL по мере прогрессирования тубулоинтерстициального фиброза и канальцевого повреждения [140], что позволяет рассматривать этот маркер в качестве показателя хронической почечной дисфункции. Многими исследователями продемонстрирован значимо более высокий уровень экскреции NGAL у пациентов с СД 2 типа и микроальбуминурией как по сравнению с пациентами с нормальными показателями альбуминурии, так и в сравнении с контролем без СД 2 типа [10, 94, 97, 147, 169, 197]. При этом уровень мочевого NGAL положительно коррелировал со значениями АКС как при СД 2 типа, так и на стадии преддиабета, доказывая важный вклад канальцевого повреждения в развитии дисфункции почек уже при начальных воздействиях гипергликемии [147]. Тем не менее, в ряде исследований не обнаружено значимой разницы в уровне экскреции NGAL у больных СД 2 типа как при нормальной альбуминурии, так и при её повышении [130]. Эти данные,

безусловно, свидетельствуют о необходимости проведения дальнейших клинических исследований по данному направлению.

В ряде работ выявлено, что экскреция NGAL значимо отрицательно коррелировала с уровнем рСКФ [94, 97, 130]. Кроме того, в отличие от экскреции коллагена IV типа, при повышенном уровне мочевого NGAL являлся предиктором как быстрого снижения СКФ, так и развития терминальной стадии ХБП и смерти [93, 95, 190, 201].

Интересно, что у крыс с экспериментальным СД также отмечалась повышенная экспрессия NGAL в проксимальных канальцах почек по сравнению с контрольной группой животных [104]. В двух работах продемонстрировано повышение выделения NGAL с мочой у крыс даже при нормальных значениях альбуминурии [78, 195], что позволяет рассматривать данный показатель как ранний мочевой маркер диагностики экспериментальной ДН.

**Молекула почечного повреждения 1 типа (kidney injury molecule-1 / KIM-1)** – трансмембранный гликопротеин, локализованный преимущественно в апикальной мембране проксимальных канальцев, содержание которого увеличивается на поверхности эпителиальных клеток при их повреждении [93, 140]. Экспрессия этого белка, наряду с NGAL, повышается по мере прогрессирования тубулоинтерстициального фиброза и канальцевого повреждения [140]. Этот маркер изначально зарекомендовал себя как чувствительный показатель острого почечного повреждения, но впоследствии была показана его высокая диагностическая и прогностическая ценность при ХБП [9, 197]. Однако значительная часть исследований по оценке мочевой экскреции KIM-1 у больных СД 2 типа демонстрирует отсутствие корреляции уровней KIM-1 в моче с АКС и отсутствие значимой разницы в группах пациентов с разным уровнем экскреции альбумина [93, 94, 97, 193]. Кроме того, в этих же работах не выявлено значимой корреляции уровня KIM-1 в моче и рСКФ [94, 97].

В экспериментах на крысах на фоне ишемического повреждения выявлена локализация этого белка в эпителии канальцев почек [213]. Несмотря на имеющиеся противоречивые данные относительно значимости KIM-1 в ранней

диагностике ДН у пациентов с СД 2 типа, в исследованиях на крысах с СД этот протеин проявил себя как чувствительный биомаркер ранней диагностики канальцевого повреждения при экспериментальной ДН [78, 186, 198].

**Печеночная форма белка, связывающая жирные кислоты (liver fatty acid-binding protein / L-FABP/ FABP1)** – цитозольный транспортный протеин небольшой молекулярной массы, экспрессия которого происходит в дистальных и проксимальных почечных канальцах, а также в печени [9, 93]. При изучении иммуногистохимически-окрашенных образцов почечных биоптатов и экскреции L-FABP было показано, что повышение выделения L-FABP с мочой связано со структурно-функциональными нарушениями в канальцах почек и коррелирует с тяжестью тубулоинтерстициального повреждения [187]. В исследовании A. Kamijo et al. (2006) с участием пациентов с ХБП недиабетического генеза было продемонстрировано, что L-FABP в сыворотке, который может иметь печёночное происхождение, не влияет на уровень L-FABP в моче [199]. Это указывает на то, что выделение L-FABP в мочу происходит, главным образом, из эпителия канальцев почек [199]. Как было показано в нескольких работах, мочевого L-FABP был значительно выше у больных СД 2 типа по сравнению со здоровым контролем и прямо коррелировал с альбуминурией и снижением клиренса креатинина [64, 208]. Однако данные об экскреции L-FABP у больных СД 2 типа при нормальных значениях альбуминурии неоднозначны. Так, в исследовании Kamijo-Ikemori A. et al. (2011) пациенты с СД 2 типа с нормоальбуминурией имели значимо более высокую экскрецию этого канальцевого белка [64]. В ряде же других работ значимая разница выявлялась начиная со стадии микроальбуминурии [63, 208]. Уровень L-FABP в моче также был повышен у больных со сниженной рСКФ и положительно коррелировал с протеин-креатининовым соотношением в моче [63]. В проспективном исследовании Kamijo-Ikemori A. et al. (2011) высокие уровни L-FABP в моче коррелировали с прогрессированием ХБП до терминальной стадии и началом гемодиализа [64]. В исследовании Fufaa G.D. et al. (2015) у индейцев Пима более высокие уровни соотношения L-FABP/креатинин в моче являлись предикторами развития

терминальной почечной недостаточности [95]. Интересно, что даже в подгруппе больных СД 2 типа без почечной дисфункции более высокие уровни L-FABP в моче были связаны с развитием и более быстрым прогрессированием ХБП [64]. Это позволяет рассматривать экскрецию L-FABP в качестве маркера прогнозирования прогрессии ДН уже на ранней стадии. Тем не менее, для уточнения диагностической значимости этого показателя в ранней диагностике ДН требуется проведение дальнейших клинических исследований.

Несмотря на то, что человеческая молекула L-FABP структурно гомологична молекуле L-FABP у крыс [107], экспериментальные исследования демонстрируют повышение экскреции этого канальцевого маркера только на стадии повышенного выделения альбумина с мочой [44], что не позволяет рассматривать эту молекулу в качестве маркера ранней диагностики экспериментальной ДН.

### **1.3 Современное представление о плеiotропных эффектах сахароснижающих препаратов на почки**

Длительное время управление СД 2 типа было, в основном, нацелено на контроль гликемии. Мета-анализ по результатам 4 фундаментальных для диабетологии исследований (ACCORD, ADVANCE, UKPDS и VADT), включающий более 27 тысяч больных СД 2 типа, подтвердил первостепенность интенсивного контроля гликемии для профилактики хронических микрососудистых осложнений СД 2 типа, в том числе диабетического поражения почек [86]. Однако, несмотря на эффективность традиционных подходов к профилактике ДН, помимо коррекции углеводного обмена включающих ингибирование РААС, нормализацию АД, веса и показателей липидограммы, пациенты с ДН по-прежнему продолжают развивать терминальную стадию ХБП [210]. Это указывает на необходимость разработки новых эффективных терапевтических подходов к профилактике и замедлению прогрессирования ДН.

Патогенетическая многофакторность и морфологическая неоднородность ДН заставляют задуматься о том, насколько универсальными являются механизмы нефропротекции. Принимая во внимание ключевую роль гипергликемии в патогенезе ДН, в последние годы активно стали изучаться нефропротективные свойства самих противодиабетических препаратов, поскольку, очевидно, умеренный благоприятный эффект на развитие ДН может оказать любой препарат, корректирующий гипергликемию. Тем не менее, по-прежнему остаётся неясным, являются ли различные сахароснижающие препараты одинаково эффективными с позиции замедления прогрессирования почечной дисфункции при СД [132]. Кроме того, почечные эффекты ССП могут реализовываться за счёт воздействия некоторых препаратов на другие традиционные факторы риска развития и прогрессии ДН – гемодинамические и метаболические [72, 128, 132]. Вероятнее всего, ожидаемы благоприятные почечные эффекты у препаратов, позитивно влияющих на менее изученные компоненты патогенеза прогрессирования ДН (эндотелиальная дисфункция, инсулинорезистентность подоцитов, тубулоинтерстициальные нарушения, воспаление, окислительный стресс, дисбаланс вазоактивных веществ, анемия, поражение автономной нервной системы и др.) [6, 25, 28, 42, 191, 205, 210]. Так, можно ожидать, что ССП, улучшающие чувствительность тканей к инсулину (бигуаниды) или оказывающие плейотропные эффекты за счёт улучшения эндотелиальной функции и уменьшения воспаления (ингибиторы дипептидилпептидазы 4 типа (иДПП-4)), способны оказать позитивное влияние на течение ДН [16, 122, 149]. Таким образом, наличие нефропротективных свойств у различных групп ССП, в особенности обладающих дополнительными метаболическими преимуществами или молекулярными механизмами воздействия на ДН, является в настоящий момент предметом поиска в экспериментальных и клинических исследованиях.

### 1.3.1 Эффекты применения метформина на почки при сахарном диабете

Бигуанид метформин является пероральным ССП 1-й линии терапии СД 2 типа, наиболее широко назначаемым для лечения СД 2 типа [33, 70]. Сахароснижающий эффект метформина отчасти реализуется путём уменьшения всасывания глюкозы в кишечнике, снижения продукции глюкозы печенью и повышения чувствительности периферических тканей к инсулину, не снижая при этом уровень глюкозы крови ниже нормальных значений [59].

Основным механизмом действия метформина является ингибирование начальных путей дыхательной цепи митохондрий, что сопровождается снижением образования аденозинтрифосфата [59, 134]. В ответ на это происходит естественная активация аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (АМФК) – своеобразного энергетического клеточного сенсора, задачей которого является более производительное расходование эндогенных энергетических субстратов за счёт стимуляции катаболизма на фоне ингибирования анаболического пути [59, 143, 167]. Активацией АМФК отчасти объясняются известные позитивные метаболические и кардиоваскулярные эффекты метформина [17, 59, 122]. В крупных эпидемиологических исследованиях метформин однозначно продемонстрировал снижение риска развития макрососудистых осложнений СД 2 типа [81, 84].

Метаболические эффекты метформина в некоторой мере могут реализовываться посредством влияния на баланс кишечных гормонов инкретин [26, 50, 133], регулирующих секрецию инсулина, скорость опорожнения желудка, эффекты насыщения в центральной нервной системе и др. [59, 92]. Так, в исследованиях была продемонстрирована способность метформина увеличивать секрецию инкретина ГПП-1, повышать экспрессию рецепторов к ГПП-1 и ингибировать фермент, участвующий в деградации ГПП-1 – дипептидилпептидазу 4 типа (ДПП-4) [26, 59, 133, 137].

Метформин положительно воздействует на такие патогенетические звенья реализации сердечно-сосудистой патологии, как компоненты метаболического синдрома (инсулинорезистентность и избыточный вес), эндотелиальную дисфункцию, проявления гиперкоагуляции и окислительный стресс [17, 122]. Из других позитивных негликемических эффектов метформина следует отметить слабое антигипертензивное действие препарата. Так, по данным мета-анализа Wulffele M.G. et. (2012), включавшего 19 исследований, терапия метформином была ассоциирована со снижением как систолического, так и диастолического АД в среднем на 1 мм рт. ст. [180]. Несмотря на то, что перечисленным факторам отводится значительная роль и в патогенезе ДН [42, 122, 168], данные о влиянии метформина на развитие и прогрессирование ДН не столь однозначны.

Метформин на 90-100% выводится в неизменённом виде почками за счёт фильтрации и активной канальцевой секреции. В этой связи считается, что при почечной дисфункции существует опасность накопления и токсического влияния метформина за счёт повышения продукции лактата [59, 122, 165]. По этой причине длительное время применение метформина ограничивалось при снижении СКФ (отмена при СКФ ниже 60 мл/мин) [34, 41]. Однако, мета-анализ Salpeter S.R. et al. (2010) с включением более 70 тысяч пациентов с СД 2 типа, получавших метформин, продемонстрировал, что частота развития лактатацидоза была сопоставима с группой больных, получавших отличные от метформина ССП [165]. Риск развития ацидоза также не увеличивался при применении метформина у больных СД 2 типа и сердечной недостаточностью [185]. Исследования, продемонстрировавшие снижение летальности на терапии метформином у пациентов при СКФ до 30 мл/мин, позволили существенно расширить терапевтические рамки назначения препарата при почечной дисфункции [1, 84, 138].

В европейской клинической практике метформин появился 60 лет назад и прописывается по меньшей мере 120 млн. пациентов во всём мире [33, 59, 70]. Несмотря на это, данные о его влиянии на развитие и прогрессирование поражения почек при СД неоднозначны. В экспериментальных исследованиях

метформин замедлял прогрессию диабетической почечной дисфункции за счёт уменьшения процессов воспаления, гликооксидации, фиброзирования и липотоксичности в почках [79, 111, 135, 136, 155, 160, 189, 214], преимущественно воздействуя на широко представленную в почках АМФК [167]. В условиях гипергликемии в клетках почек инактивируются механизмы защиты клеток, такие как активация АМФК и аутофагии. При этом усиливаются патологические каскады, такие как мишень для рапамицина млекопитающих (mTOR), стресс эндоплазматического ретикулума, эпителий-мезенхимальная трансформация, окислительный стресс и гипоксия [143]. Показано, что активация каскада mTOR стимулирует синтез белкового матрикса с последующим его накоплением в ГБМ и мезангии, стимулирует пролиферацию фибробластов и экспрессию цитокинов с провоспалительной и профибротической активностью [143, 166, 167]. Все эти патологические пути взаимосвязаны с передачей сигналов АМФК в почках, на основании чего можно предполагать положительное влияние метформина, как активатора этого фермента, на молекулярные звенья патогенеза ДН.

В исследовании Lee M.J. et al. (2007) на модели крыс с СД 1 типа было показано, что кратковременная терапия метформином в дозе 300 мг/кг, вводимая перорально в течение 4 дней, активировала АМФК, ингибируя тем самым активацию сигнального пути mTOR, что приводило к значимому уменьшению гипертрофии клубочковых эпителиальных клеток [46]. В исследовании Kim H. et al. (2015), используя эпителиоциты канальцев почек, была продемонстрирована способность метформина ослаблять стресс эндоплазматического ретикулума и профибротические процессы под воздействием различных повреждающих стимулов, в том числе в условиях повышенной концентрации глюкозы [49]. На культуре клеток почечного канальцевого эпителия было показано, что метформин за счёт механизмов активации АМФК способен снижать продукцию активных форм кислорода, тем самым ингибируя апоптоз и синтез провоспалительных и профибротических цитокинов в канальцевых эпителиоцитах [214]. Одним из вероятных защитных механизмов в отношении



клеток канальцевого эпителия при воздействии метформина может являться АМФК-mTOR-зависимая активация аутофагии – универсального механизма уничтожения образовавшихся повреждённых агрессивных структур [27, 143]. Кроме того, в работе Такиyаmа Y. et al. (2014) показана способность метформина ингибировать гипоксические процессы в почках, которые лежат в основе развития и прогрессирования фиброза тубулоинтерстиция [189]. Так, уменьшая экспрессию канальцевыми эпителиоцитами индуцированного гипоксией фактора-1 $\alpha$ , метформин по АМФК-зависимому пути увеличивал количество глюкозных транспортеров в клетке. Это повышало утилизацию глюкозы, снижая потребность канальцевых эпителиоцитов в кислороде [189]. В эксперименте на крысах линии Zucker Diabetic Fatty это проявлялось в уменьшении морфологических проявлений тубулоинтерстициального фиброза после 30-недельной терапии метформином в дозе 250 мг/кг [189].

В исследовании Kim J. et al. (2012) на фоне терапии метформином у спонтанно развивающихся СД крыс линии Torii показано замедление повреждения подоцитов за счёт ингибирования окислительных процессов [160]. Аналогичный эффект ослабления окислительного стресса при стрептозотоцин-индуцированном СД у крыс был показан в работе Alhaider A.A. et al. (2011) [136]. Это сопровождалось замедлением развития функциональных и морфологических нарушений, характерных для ДН [136, 160]. Тем не менее, в описываемых работах использовались модели СД у крыс с выраженной гипергликемией, более характерной для моделей СД 1 типа.

Таким образом, результаты ряда экспериментальных работ на животных и клеточных культурах демонстрируют различные молекулярный механизмы потенциального позитивного воздействия метформина на различные почечные структуры, в том числе и тубулоинтерстициальную ткань. Однако в доступной литературе отсутствуют клинические и экспериментальные данные об эффектах терапии метформином на показатели канальцевой функции. Имеющие клинические исследования, в которых оценены эффекты метформина на

рутинные почечные маркеры, в большинстве своём не показали убедительного позитивного влияния.

При 10-летнем наблюдении больных СД 2 типа, принимавших участие в исследовании UKPDS (UKPDS80) и получавших терапию метформином, риски повышения АКС и нарастания креатинина сыворотки были сопоставимы с группой традиционного лечения (диета) [215]. В исследовании ADOPT кратковременная терапия метформином в сравнении с розиглитазоном не снижала микроальбуминурию, а в долгосрочной перспективе метформин не защищал от развития микрососудистых осложнений диабета [158]. Однако, в проведённом Hung A. et al. (2012) ретроспективном когортном исследовании, включавшем 93577 больных из Национальной базы данных ветеранов, риск прогрессирования ХБП на терапии метформином и розиглитазоном значимо не отличался и был достоверно ниже в сравнении с препаратами группы сульфонилмочевины [67]. Таким образом, согласно литературным данным, метформин оказался неэффективен в отношении уменьшения экскреции альбумина с мочой как в краткосрочных, так и в длительных клинических исследованиях. Лишь в одном исследовании Amador-Licona N. et al. с участием 28 больных СД 2 типа, получавших метформин, было продемонстрировано значимое уменьшение альбуминурии без существенного влияния на почечную гемодинамику по сравнению с глибенкламидом [183]. Авторы связали данный эффект с улучшением течения артериальной гипертензии, а также показателей липидного спектра, контроля гликемии и уменьшением инсулинорезистентности [183]. Не исключено, что отсутствие значимого влияния метформина на почечную функцию в большинстве клинических исследований связано с ограниченным набором маркеров, отражающих лишь некоторые звенья патогенеза ДН. С этой позиции исследования с участием экспериментальных животных позволяют исследовать динамику не только функциональных, но и морфологических изменений, в том числе на ультраструктурном уровне.

### 1.3.2 Эффекты применения вилдаглиптина на почки при сахарном диабете

Вилдаглиптин является пероральным ССП из относительно новой группы ингибиторов фермента ДПП-4, замедляющего деградацию и тем самым продлевающего действие эндогенных кишечных гормонов инкретин глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (ГИП) и энтероглюкагона (или ГПП-1) [8, 100]. Большее клиническое значение имеет ГПП-1, который вырабатывается L-клетками желудочно-кишечного тракта в ответ на приём пищи и стимулирует постпрандиальную секрецию инсулина при одновременном подавлении выработки глюкагона [8, 100]. Глюкозозависимое действие ГПП-1 на  $\beta$ - и  $\alpha$ -клетки поджелудочной обуславливает эффективное снижение глюкозы крови без риска гипогликемических состояний [8, 100].

Гликемические эффекты иДПП-4 выходят на первый план при выборе терапии для пациентов, имеющих высокий риск гипогликемий – пожилых, с сердечно-сосудистой патологией и с почечной дисфункцией [108]. Несмотря на то, что вилдаглиптин на 85% выводится почками (в неизменённом виде – 25%) [141], в клинических исследованиях вилдаглиптин хорошо переносился пациентами как с умеренной, так и тяжёлой ХБП на фоне коррекции дозы [148]. В исследовании Lukashevich V. et al. (2013) 24-недельное добавление вилдаглиптина в дозе 50 мг/сутки больным СД 2 типа с тяжёлой ХБП (СКФ<30 мл/мин/1,73<sup>2</sup>) с неудовлетворительным контролем гликемии на инсулинотерапии при эффективном снижении HbA<sub>1c</sub> (-0,9%±0,4%) и высокой безопасности не было ассоциировано с набором веса, а по частоте развития гипогликемий было сопоставимо с плацебо [89].

Вилдаглиптин обладает хорошим профилем сердечно-сосудистой безопасности, а также проявляет ряд благоприятных метаболических эффектов [2, 35, 90]. По данным мета-анализа Bekiari E. et al. (2016), включавшего 69 исследований с участием более 28000 пациентов с СД 2 типа, применение

вилдаглиптина как в качестве монотерапии, так и в сочетании с другими ССП не увеличивает риск развития каких-либо неблагоприятных кардиоваскулярных исходов и событий [175]. Авторами сообщается о высокой сахароснижающей эффективности препарата без риска развития гипогликемических эпизодов в сравнении с другими ССП (относительный риск 0,19; 95% доверительный интервал от 0,15 до 0,24 при высокой разнородности групп, равной 78%) [175]. Объединённый анализ Evans M. et al. (2016), включавший более 2000 пациентов с СД 2 типа, продемонстрировал способность вилдаглиптина мягко снижать диастолическое и систолическое АД, улучшать показатели липидного спектра с преимущественным влиянием на уровень триглицеридов, холестерина ЛПНП, а также умеренно снижать ИМТ [90], несмотря на считающийся вес-нейтральным эффект в целом группы иДПП-4 [1, 132]. Тем не менее, вероятные, потенциальные позитивные эффекты иДПП-4 в отношении почечной функции выходят далеко за пределы безопасного снижения гликемии и коррекции метаболических нарушений.

В экспериментальных исследованиях многие представители группы иДПП-4 проявляли почечные плеiotропные эффекты, что может свидетельствовать о нефропротективном потенциале сывороточного ингибирования ДПП-4 [16, 102, 149]. Увеличение уровня и продолжительности жизни эндогенного ГПП-1 на терапии иДПП-4 может повышать активацию рецепторов ГПП-1 в различных почечных структурах и эндотелии сосудов [8, 98], оказывая антипролиферативный эффект и снижая проявления окислительного стресса [16, 55, 75]. Кроме того, плеiotропные почечные эффекты иДПП-4 могут быть связаны с изменением профиля множества субстратов действия ДПП-4 [16, 55, 123]. Так, циркулирующая форма ДПП-4 участвует в деградации множества нейропептидов, гормонов, регуляторных пептидов, цитокинов и ростовых факторов. Эти субстраты обладают натрийуретическими свойствами (мозговой и предсердный натрийуретические пептиды, нейропептид Y), оказывают противовоспалительные эффекты (меприн  $\beta$ , натрийуретические пептиды), приводят к вазодилатации (натрийуретические пептиды, нейропептид Y, пептид

УУ) и прямой защите почечных клеток (меприн  $\beta$ , продуцируемый стромальными клетками фактор-1) и др. [16, 55, 123]. Доказано, что ДПП-4, являясь также внеклеточной структурной единицей антигена CD26 лимфоцитов, выполняет важную лиганд-рецепторную функцию при взаимодействии клеток иммунной системы, тем самым оказывая иммуномодулирующий эффект [131]. Эндотелиоциты клубочковых капилляров и эпителиоциты проксимальных канальцев при СД активно экспрессируют ДПП-4 [76, 109]. Не исключено, что ингибиторы ДПП-4 с преимущественно почечным путём элиминации, в частности, вилдаглиптин, непосредственно контактируя с этими почечными структурами, окажутся более эффективными с позиции нефропротекции.

Основная часть экспериментальных работ, в которых исследовался нефропротективный потенциал ингибиторов ДПП-4, посвящена линаглиптину, саксаглиптину и ситаглиптину [16, 55, 175]. Вместе с тем, доклинические исследования, изучающие почечные эффекты вилдаглиптина, немногочисленны. В работе Liu W. et al. (2012), выполненной на крысах с экспериментальным СД 1 типа, вилдаглиптин дозозависимо оказывал нефропротективный эффект, значимо не снижая уровень гликемии [75]. После 24 недель непрерывной терапии вилдаглиптином, растворённым в питьевой воде в дозе 4 и 8 мг/кг, у крыс отмечалось значимое уменьшение альбуминурии, креатинина сыворотки, замедление утолщения ГБМ и развития тубулоинтерстициального фиброза. Авторы связали наблюдаемый эффект с повышением уровня эндогенного ГПП-1 и активацией соответствующих рецепторов в канальцах и клубочках почек, что приводило к увеличению уровня вторичного посредника циклического АМФ [75]. Известно протективное участие этого мессенджера в запуске каскада с участием протеинкиназы А и последующим уменьшением образования конечных продуктов гликирования и активных форм кислорода [102]. В цитируемом исследовании вилдаглиптин значимо снижал экскрецию маркера свободнорадикального повреждения ДНК – окисленного производного дезоксигуанозина, а также уменьшал экспрессию белков апоптоза и воспаления в клетках почечного эпителия [75]. Противовоспалительный потенциал

вилдаглиптина также исследован на клеточных культурах. Так, в работе Y. Tanaka et al. (2016) на культуре мышинных клеток канальцев почек при воздействии жирных кислот, связанных с альбумином, продемонстрирована способность различных иДПП-4, включая вилдаглиптин, ингибировать гиперэкспрессию провоспалительного хемоаттрактанта MCP-1 [161]. Способность улучшать СКФ и снижать протеинурию при 4-недельном назначении вилдаглиптина продемонстрирована у крыс без СД на модели хронической сердечной недостаточности в исследовании Arruda-Jr. D.F. et al. (2016) [74]. Улучшение показателей почечной функции и увеличение натрийуреза было ассоциировано с повышением сывороточной концентрации ГПП-1, активацией протеинкиназы А и снижением активности ДПП-4. Антипротеинурический эффект препарата при этом был опосредован повышением активности рецептора мегалина, являющегося фактором выживания клеток проксимальных канальцев, а также предотвращением потери основных белков гломерулярного фильтра подоцитов – нефрина и подоцина [74].

Известные на сегодняшний день исследования с участием больных СД 2 типа, в которых описан гипоальбуминурический эффект добавления терапии вилдаглиптином [45, 177, 209], являются пилотными, выполненными без введения групп сравнения. В этой связи клиническая сторона вопроса по-прежнему остаётся малоизученной.

В 2016 г. Kolaczynski W.M. et al. были опубликованы результаты ретроспективного когортного исследования с участием 16321 пациента с СД 2 типа из электронной медицинской базы данных Германии. Согласно его результатам, на терапии вилдаглиптином, по сравнению с препаратами группы сульфонилмочевины, продемонстрирована значимо более низкая частота развития диабетической ретинопатии и нейропатии [139]. Однако частота развития ДН у пациентов, получавших вилдаглиптин, хотя и была снижена, но статистически незначимо (отношение рисков 0,90,  $p=0,39$ ) [139]. Таким образом, не вызывает сомнений необходимость проведения проспективных рандомизированных

контролируемых исследований, призванных оценить почечные эффекты вилдаглиптина.

#### **1.4 Способы экспериментального моделирования диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа**

Необходимым условием для осуществления доклинических исследований в области фармакологической нефропротекции является выбор валидной экспериментальной модели ДН при СД 2 типа, которая с высокой степенью точности воспроизведёт структурные и функциональные почечные нарушения, развивающиеся в клинической ситуации.

##### **1.4.1 Критерии экспериментального сахарного диабета 2 типа**

Согласно данным Peterson R.G. et al., развитие экспериментального СД у грызунов подтверждается оценкой уровня гликемии натощак (после 8-12 часов голода) с последующим выполнением глюкозотолерантного теста с пероральным или парентеральным введением раствора глюкозы [60]. Для экспериментального СД 2 типа характерно развитие гипергликемии от 9,0 до 14,0 или от 14,0 до 21,0 ммоль/л (в зависимости от требований эксперимента) и более чем 2-кратное повышение рассчитанной площади под кривой глюкозы по результатам глюкозотолерантного теста в сравнении с контрольными животными без СД [60].

### **1.4.2 Лабораторные и морфологические критерии валидации модели диабетической нефропатии у грызунов**

Американский консорциум по моделям осложнений СД у экспериментальных животных (The US-based AMDCC) предложил следующие лабораторные и морфологические критерии, необходимые для валидации модели ДН у грызунов [184]: 1) двукратное снижение клиренса креатинина за период наблюдения за животным; 2) более чем 50-кратное повышение альбуминурии по сравнению с контролем без СД; 3) структурные изменения: развитие артериологипертензии, мезангиального склероза и тубулоинтерстициального фиброза, а также ультраструктурные изменения, включающие утолщение ГБМ более 50% от исходного уровня.

### **1.4.3 Описанные экспериментальные модели диабетической нефропатии у крыс**

Известны генетические линии грызунов с СД, у которых описаны почечные изменения, в некоторой степени соответствующие критериям AMDCC [51, 184]. Однако такие животные имеют значительные ограничения в использовании, связанные с трудностями в воспроизведении, сложностями ухода, высокой степенью инбридинга, а также с их высокой стоимостью и недоступностью для многих экспериментальных лабораторий. Кроме того, наследование диабета у таких животных в некоторых случаях носит моногенный характер, что почти не встречается среди пациентов [173]. У крыс линии Zucker Diabetic rats, считающейся «золотым стандартом» в изучении метаболического синдрома, СД 2 типа развивается спонтанно ещё до полового созревания вследствие генетического дефекта в рецепторе лептина [60], встречаемость которого в



человеческой популяции невысока [150]. Кроме того, сообщается о частом формировании у крыс этой линии воспалительных и гранулематозных изменений в почечной ткани [116], что снижает валидность этой модели и затрудняет интерпретацию полученных гистологических и лабораторных результатов.

Описаны модели ДН без генетических дефектов у экспериментальных животных, в которых дисфункция  $\beta$ -клеток поджелудочной железы индуцируется введением аутбредным крысам стоков Wistar и Sprague-Dawley диабетогенного вещества стрептозотоцина (СТЗ). Механизм его повреждающего действия на инсулин-секретирующие клетки связан с использованием глюкозного переносчика GLUT-2 для проникновения в клетки с дальнейшим повреждением их ДНК [176, 178]. Это, в свою очередь, приводит к гиперактивации ДНК-репарирующего фермента поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) с развитием энергетического дефицита клеток и гибели инсулоцитов [176, 178].

Для воспроизведения стрептозотоциновых моделей СД и ДН у грызунов используются высокие и средние дозы СТЗ. Модели СД у крыс, в которых применяют однократно парентерально вводимые высокие дозы СТЗ (55-80 мг/кг), характеризуются развитием выраженной инсулиновой недостаточности (модель СД 1 типа) [178]. Это накладывает определённые ограничения на их использование, связанные с возникновением тяжелой гипергликемии, быстрой декомпенсации СД и высокой летальностью экспериментальных животных [178]. Невозможность моделирования метаболических нарушений (инсулинорезистентность, ожирение и дислипидемия) в таких моделях не позволяет адекватно транслировать полученные результаты в клинику при изучении действия лекарственных средств для лечения СД 2 типа.

Описаны модели СТЗ-индуцированного СД и ДН у грызунов, в которых путём однократного или многократного введения невысоких доз СТЗ удаётся добиться неполного разрушения инсулоцитов и тем самым избежать развития выраженной гипергликемии [105, 120, 179]. При этом инсулинорезистентность, ожирение и дислипидемия моделируются введением в рацион различных по составу и длительности вариантов высокожирового питания [82, 120]. Zhang M.

et al. (2008) описана экспериментальная модель СД 2 типа, в которой нарушение углеводного обмена индуцировалось у крыс стока Wistar с алиментарным ожирением посредством внутрибрюшинного введения СТЗ в дозе 30 мг/кг с 7-дневным интервалом [179]. Однако характерные для ДН почечные нарушения в данной модели не описаны.

Описана модель почечных нарушений при неонатальном СД 2 типа, в которой крысам линии Wistar Kyoto в возрасте 2 дней вводился внутрибрюшинно СТЗ с последующим выполнением на 4-й неделе жизни правосторонней нефрэктомии [157]. Несмотря на значимое изменение клиренса креатинина, в исследовании не оценены другие важные признаки формирования ДН – альбуминурия и патогномоничные морфологические изменения [157].

Sugano M. et al. (2006) описали модель ДН при СД 2 типа у крыс линии Sprague-Dawley, в которой половозрелым самцам крыс, получившим однократную внутривенную инъекцию СТЗ в дозе 40 мг/кг и переведенных впоследствии на высокожировое питание, для ускорения наступления почечных изменений выполнялась правосторонняя нефрэктомия [105]. В данной модели значимые патогномоничные для ДН изменения в почечной ткани развивались на 35-й неделе после введения СТЗ [105]. Несмотря на воспроизведение у таких животных метаболических нарушений и последовательных морфологических изменений в клубочках почек, наблюдаемых у пациентов с СД 2 типа, характерные для ДН изменения в тубулоинтерстиции в работе не описаны [105].

Ещё одним эффективным способом уменьшения панкреатотоксического эффекта СТЗ является предварительное внутрибрюшинное введение никотинамида (НА), ингибирующего активирующийся при воздействии СТЗ вышеупомянутый фермент PARP, тем самым уменьшая некротические процессы в  $\beta$ -клетках [176]. Модель СТЗ-НА-индуцированного СД 2 типа ранее успешно была применена на практике многими зарубежными исследователями [114, 176] и нашими соотечественниками [43]. Однако без высокожирового питания и нефрэктомии специфических лабораторно-морфологических признаков ДН у крыс в этих работах не выявлено. В описанной Khanra R. et al. (2015) модели СТЗ-

НА-индуцированной ДН к 28 дню эксперимента сообщается о незначительных начальных почечных нарушениях [47]. Во всех цитируемых работах не исследованы тубулоинтерстициальные изменения как один из гистологических критериев валидации модели ДН. Таким образом, описанные негенетические модели СТЗ-индуцированного СД 2 типа у крыс нельзя считать оптимальными для изучения патогенетических и фармакологических аспектов ДН.

## Глава 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1 Материалы и методы экспериментальной части исследования

Данная часть исследования ставила перед собой задачу разработки валидной экспериментальной модели ДН при СД 2 типа с целью оценки влияния терапии метформином или вилдаглиптином на формирование функциональных и морфологических клубочковых и канальцевых почечных диабетических изменений.

##### 2.1.1 Объект исследования и структура эксперимента

Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [29] и соответствовали этическим нормам, изложенным в 8-м издании «Guide for the care and use of laboratory animals» (2011 г.).

Исследование проведено на 45 половозрелых самцах крыс стока Wistar (массой 180-210 г), которых содержали в условиях стандартного светотемнового цикла при свободном доступе к питьевой воде и пище.

Находящимся на стандартном лабораторном пищевом рационе крысам в условиях асептики и антисептики после наркотизирования пентобарбиталом натрия (50 мг/кг внутривенно) выполнялась правосторонняя нефрэктомия с использованием заднепоясничного доступа. Перед этим для сохранения надпочечников почку декапсулировали. С целью стандартизации все процедуры

и операции выполнялись во временном интервале от 8:00 до 12:00. Протокол хронического эксперимента изображён на Рисунке 1.

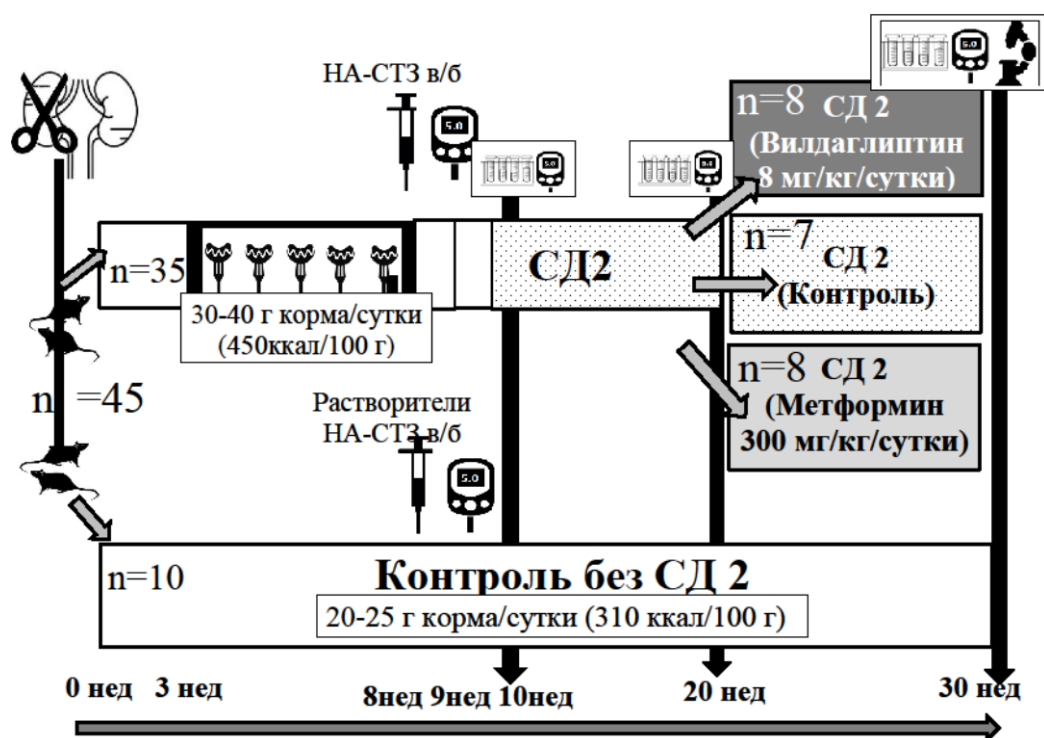


Рисунок 1 – Протокол экспериментального раздела исследования

Через 3 недели после правосторонней нефрэктомии 35 случайным образом отобранных крыс были переведены на 5 недель на высокожировое питание с добавлением к стандартному корму говяжьего сала. При этом итоговая общая калорийность питания составила 450 ккал/100 г, из которых 20% приходилось на жиры, 48% - на углеводы и 20% - на белки. По окончании периода высокожирового питания крысам после 12 часов голода внутрибрюшинно последовательно с интервалом в 15 минут вводились раствор НА (в дозе 230 мг/кг) и СТЗ (в дозе 65 мг/кг) согласно протоколу, описанному Islam S. и Choi H. [43, 114]. НА (производитель Herba Nemosan, Австрия) предварительно растворялся в 0,9% растворе хлорида натрия. СТЗ (производитель Sigma Aldrich, США) растворялся в свежеприготовленном натриевом цитратном буфере согласно описанной методике [178].

Десять геминефрэктомированных крыс контрольной группы на протяжении всего эксперимента получали стандартное лабораторное питание (гранулированный полнорационный корм для грызунов, рецептура ПК-120 производства ООО «Лабораторкорм», Россия), содержащий 5% жиров, 48% углеводов и 18% белков с общей калорийностью 310 ккал/100 г. Крысам контрольной группы вместо НА и СТЗ в аналогичные сроки внутривнутрибрюшинно вводились их растворители объёмом 0,5 мл (контроль без СД 2).

Через 7 дней после введения НА-СТЗ/ их растворителей выполнялся оральная глюкозотолерантный тест. После отбора животных с резвившимся СД 2 типа (согласно критериям Peterson R.G. et al. [60]) крысы были разделены на 3 группы в зависимости от назначенной на двадцатой неделе эксперимента терапии:

- 1) крысы с СД 2 типа, которым на последующие 10 недель назначалась терапия метформином (Merck Sante s.a.s., Франция) в дозе 300 мг/кг/сутки с питьевой водой – группа СД 2 (метформин);
- 2) крысы с СД 2 типа, которым на протяжении последних 10 недель эксперимента назначалась терапия вилдаглиптином (Novartis Pharma Stein, Швейцария) в дозе 8 мг/кг/сутки с питьевой водой – группа СД 2 (вилдаглиптин);
- 3) крысы с СД 2 типа, которым на 10 недель в качестве контрольного вещества в воду добавлялся крахмал 50 мг/л – группа СД 2 (контроль). При подъёмах гликемии выше 14 ммоль/л на протяжении эксперимента животным вводился подкожно инсулин изофан 1-2 единицы.

## **2.1.2 Методы лабораторного подтверждения сахарного диабета 2 типа и диабетической нефропатии**

### **Метаболические показатели**

Для выполнения оральной глюкозотолерантного теста на 9-й неделе эксперимента (через 1 неделю после инъекции НА-СТЗ/их растворителей) 40%-й

раствор глюкозы из расчёта 3 г/кг вводился каждой крысе перорально через пластиковый зонд. С помощью глюкометра OneTouch Ultra, Johnson and Johnson (США) уровень глюкозы крови (по плазме) из хвостовой вены определялся на 0-й, 30-й, 60-й и 120-й минутах после введения глюкозы. Критерием экспериментального СД 2 типа считали развитие гипергликемии натощак от 9,0 до 14,0 ммоль/л и более чем 2-кратное повышение рассчитанной площади под кривой глюкозы по результатам орального глюкозотолерантного теста (по сравнению с контрольными животными без СД) [60]. При несоответствии определяемых показателей критериям экспериментального СД крысы исключались из исследования.

На 10-й, 20-й неделе эксперимента в крови из хвостовой вены, а также по окончании исследования на 30-й неделе в крови, взятой из брюшной аорты, определяли следующие показатели: гликированный гемоглобин (HbA1c) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на анализаторе BioRad d10, США); глюкозу, холестерин, триглицериды (с использованием реактивов и анализатора Cobas Integra 400 plus Roche, Франция), а также инсулин (ИФА-набор ALPCO Diagnostics, США).

Рассчитывали индекс инсулинорезистентности HOMA-IR по формуле (1) [171].

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

В первые 10 недель эксперимента масса тела измерялась каждые 2 недели. Уровень глюкозы крови (после 8 часов голода) из хвостовой вены оценивался в начале высокожирового питания и после его окончания, на 9-й неделе, далее – каждую неделю (глюкометром OneTouch Ultra, Johnson and Johnson, США) наряду с определением массы тела.

### Показатели почечной функции

На 10-й, 20-й неделе и 30-й неделе эксперимента в крови определялись креатинин и мочеви́на (энзиматическим методом с использованием реактивов и анализатора Cobas Integra 400 plus Roche, Франция). В эти же сроки у крыс собирали суточную мочу, для чего животные на 24 часа помещались в индивидуальные метаболические камеры. Определяли объём выделившейся мочи.

На анализаторе открытого типа ELx800 (США) в дублях определяли концентрацию альбумина в моче (с использованием ИФА-набора Assaypro, США), уровни KIM-1 и NGAL (с применением ИФА-наборов фирмы Abscam, США). Рассчитывалась экскреция почечных маркеров за 24 часа.

Рассчитывался клиренс креатинина по формуле (2).

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

### 2.1.3 Методы морфологического подтверждения почечных диабетических изменений и морфометрического анализа

Подготовка срезов почечной ткани для светооптической микроскопии выполнялась на базе патологоанатомического отделения ПСПбГМУ им. И.П.Павлова. Подготовка к электронной микроскопии и морфометрический анализ выполнялись на базе и с использованием оборудования Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Электронная микроскопия выполнялась на базе ресурсного центра «Клеточные молекулярные технологии изучения растений и грибов» ЦКП БИН им. В.Л.Комарова РАН.



### Светооптическая микроскопия

Для светооптической микроскопии кусочки паренхимы почки фиксировали в 4% формалине в течение 24 ч, проводили в спиртах возрастающей крепости и заливали в парафин. Изготавливали серийные парафиновые полутонкие срезы на микротоме Leica EM UC7 (Австрия) с последующим проведением ШИК-реакции (для оценки клубочковых нарушений) и трихромного окрашивания по Массону (для исследования повреждения в области канальцев и интерстиция). Для окрашивания применялись наборы фирмы Bio-Optica (Италия). Окрашенные срезы просматривались на инвертированном микроскопе Leica DMI6000 (Австрия), документирование проводилось с использованием встроенной камеры Leica DFC495 с 8 Мп CCD.

**Индекс мезангиальной экспансии.** Мезангиальная экспансия определялась при увеличении количества ШИК-позитивного вещества в области мезангия с наличием или отсутствием гиперклеточности [85]. Для расчёта индекса мезангиальной экспансии не меньше 35 клубочков в срезе подвергались индивидуальному учёту с присвоением условного балла каждому просмотренному, где баллом «0» обозначался нормальный клубочек. Присвоение балла «1» означало экспансию мезангиального матрикса от 0 до 25%, «2» показывало экспансию от 25 до 50% площади клубочка, «3» – 50-75%, балл «4» присваивался при почти полной экспансии мезангия (75-100%). После этого для каждого среза рассчитывался общий балл по формуле (3) [85].

$$\text{ИМЭ} = \frac{(1 \times N \text{ с баллом "1"}) + (2 \times N \text{ с баллом "2"}) + (3 \times N \text{ с баллом "3"}) + (4 \times N \text{ с баллом "4"})}{\text{общее число просмотренных клубочков в срезе}} \quad (3),$$

где ИМЭ – индекс мезангиальной экспансии ( в произвольных единицах);

N – количество клубочков в срезе, получивших соответствующий балл.

**Индекс гломерулосклероза.** Окрашенные реактивом Шиффа срезы использовали для полуколичественного расчёта индекса гломерулосклероза, который определялся как спадение и/или запустение клубочковых капилляров в сочетании с артериологиалинозом: от «1» при вовлечении в патологический процесс до 25% капиллярной сети с начальными признаками экспансии мезангия до «4» при почти полной облитерации клубочковых капилляров (от 75 до 100%) [156]. После этого для каждого среза почки рассчитывался средний балл, как описано выше в формуле (3).

**Индекс тубулоинтерстициального фиброза.** Для полуколичественного расчёта индекса тубулоинтерстициального фиброза использовали срезы, окрашенные трихромом по Массону. С этой целью каждый почечный срез разделялся на 8 областей (поровну из коркового и юкстагломерулярного регионов), микрофотографии которых (сделанные на увеличении  $\times 200$ ) были обработаны в программе для анализа изображений ImageJ версия 1,5 (Национальный Институт здоровья, США). Каждой проанализированной области был присвоен условный балл, согласно Bai X. et al. [58]. При этом балл «0» означал отсутствие изменений, «1» - фиброз менее 25% общей площади, «2» - фиброз занимал от 25% до 50% , «3» - при вовлечении более 50% исследуемой области тубулоинтерстиция [58]. Далее для каждого исследованного образца рассчитывался средний балл (в произвольных единицах).

### **Электронная микроскопия**

Трансмиссионная электронная микроскопия была использована для оценки толщины ГБМ. Для этого небольшие кусочки почечной коры погружались на 12 часов путём иммерсии в раствор 2,5% глутаральдегида в 0,1 М какодилатном буфере с рН 7,2. Затем на протяжении 1 часа производилась вторичная фиксация в 1,0% четырёхокси осмия и обезвоживание в спиртах и ацетоне возрастающей крепости. В дальнейшем материал заключался в эпоксидную смолу (Embed 812, EMS, США). Подготовленные на ультратоме Leica EM UC7 (Австрия) срезы помещались на предметные сетки и дважды контрастировали 0,5% ацетатом свинца и 3% цитратом свинца. Ультраструктура клубочков изучалась на

трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 plus (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), работающем при 120 кВ. Документирование производилось с помощью BM-2k-120 двухскоростной цифровой камере TRS (Германия), вмонтированной в оптическую ось.

Толщина ГБМ оценивалась на полученных изображениях, используя программу для анализа изображений ImageJ версия 1,5 (Национальный Институт здоровья, США). Для этого, после проведения калибровки, оценивалась длина перпендикуляров (в нм), опущенных от наружного к внутреннему листкам ГБМ, в не менее чем 30 выбранных точках (каждый 1 мкм длины ГБМ).

## **2.2 Материалы и методы клинической части исследования**

Эта часть исследования была направлена на исследование маркеров повреждения почек у больных с СД 2 типа и оценку 6-месячного добавления терапии метформином или вилдаглиптином на почечные показатели и биомаркеры, а также метаболические и гемодинамические показатели, нецелевые уровни которых ассоциированы с развитием и прогрессией ДН. Дизайн клинического исследования представлен на Рисунке 2. Все участники исследования подписывали информированное согласие.

В период с апреля 2013 года по апрель 2014 года в одномоментное поперечное исследование было включено 84 больных СД 2 типа на терапии инсулином с удовлетворительными параметрами гликемии и АД и 26 участников без СД 2 типа и ХБП соответствующего пола, возраста, с сопоставимыми показателями АД и липидограммы, без тяжёлых макрососудистых заболеваний в анамнезе.

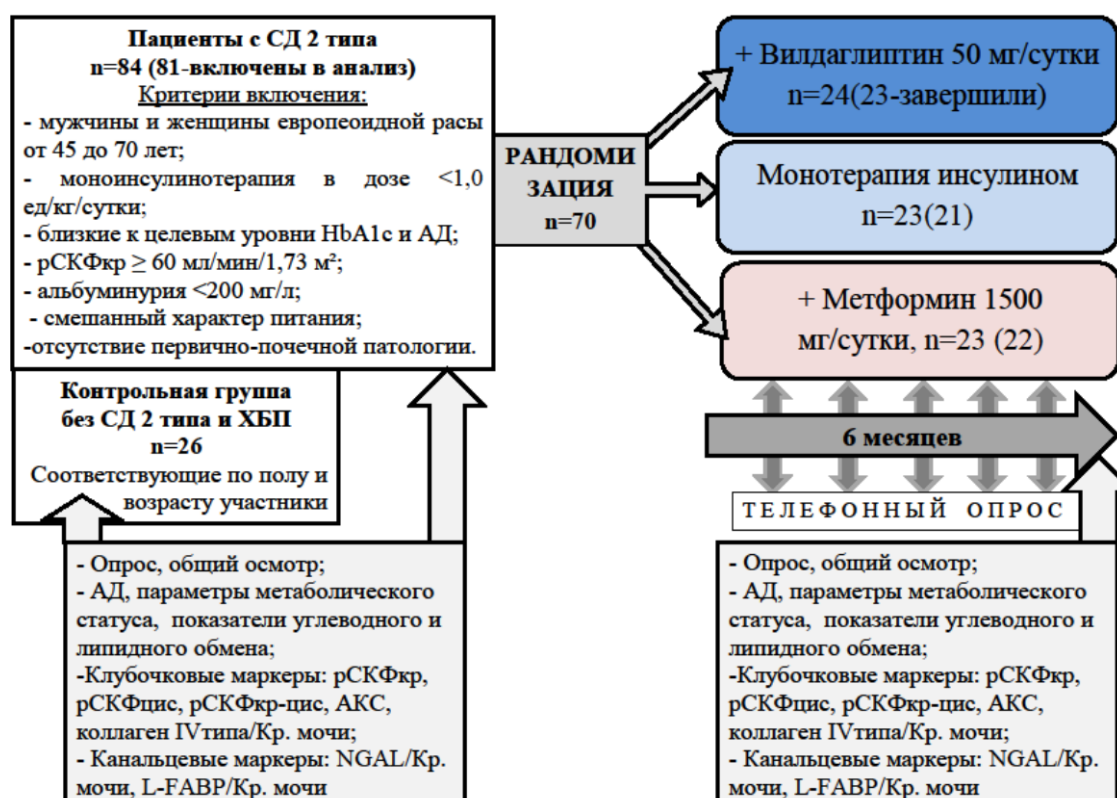


Рисунок 2 – Дизайн клинического раздела исследования

### 2.2.1 Общая характеристика обследованных участников и дизайн исследования

Критериями включения в группу пациентов являлись:

1. пол, возраст и раса (включались мужчины и женщины европеоидной расы в возрасте от 45 до 70 лет);
2. наличие СД 2 типа на монотерапии инсулином в суммарной суточной дозе <1,0 единиц/кг;
3. уровни HbA1c и АД, близкие к индивидуальным целевым значениям (превышение HbA1c не более 0,5%);
4. рСКФкр, рассчитанная по формуле СКД EPI,  $\geq 60$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>;

5. концентрация альбумина в утренней порции мочи  $<200$  мг/л, подтверждённая как минимум в 2 из 3 анализов мочи;

6. смешанный характер питания.

Критериями невключения являлись:

1. тяжёлые микро- и макрососудистые осложнения СД 2 типа (пролиферативная диабетическая ретинопатия, нейропатические язвы стоп, автономная диабетическая нейропатия, хроническая сердечная недостаточность III-IV ф.к. по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца, тяжёлая стабильная стенокардия), острые сердечно-сосудистые события в анамнезе менее 6 месяцев до начала исследования;

2. патологически изменённый мочевой осадок, первично-почечная патология недиабетического генеза;

3. гиперплазия предстательной железы с признаками обструкции мочевыводящих путей;

4. некорригируемая дислипидемия;

5. печёночная недостаточность, более чем 2-кратное повышение уровня печёночных трансаминаз;

6. указания на злоупотребление алкоголем;

7. анемия средней и тяжёлой степени;

8. рентгено-контрастные исследования, приём нефротоксичных препаратов менее чем за 6 месяцев до начала исследования, регулярный приём нестероидных противовоспалительных препаратов (за исключением аспирина);

9. тиреоидная дисфункция;

10. ИМТ  $\geq 40$  кг/м<sup>2</sup>;

11. онкологические заболевания в анамнезе;

12. системные аутоиммунные заболевания; терапия иммуносупрессантами, иммуномодуляторами, биологическими препаратами и т.п.;

13. низкая комплаентность пациента;

14. беременность, лактация.

Поскольку включённые пациенты далее приняли участие в проспективном исследовании с назначением метформина или вилдаглиптина, критериями невключения также являлись: лактатацидоз в анамнезе; планирующиеся хирургические вмешательства в период исследования; гиперчувствительность к любым компонентам, входящим в состав таблетки метформина и вилдаглиптина.

Критериями досрочного исключения в ходе проспективного исследования, в которое были включены 70 больных СД 2 типа из числа обследованных, являлись:

1. большие хирургические вмешательства, обширные травмы, тяжёлые инфекции, острые состояния;
2. назначение/смена антигипертензивной, гиполипидемической терапии, а также изменение получаемого вида инсулина в течение всего срока исследования;
3. значительное изменение питьевого режима между визитами.

Все включенные в проспективное исследование пациенты с СД 2 типа были рандомизированы с помощью генератора случайных чисел на 3 группы в зависимости от назначаемой на последующие 6 месяцев сахароснижающей терапии:

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

### **2.2.2 Клинические методы обследования**

Клиническое обследование пациентов включало анализ жалоб, истории заболевания и его осложнений, сопутствующих хронических заболеваний и

постоянной медикаментозной терапии, статус курения. Оценивалось состояние компенсации СД 2 типа по показателям самоконтроля гликемии. В анализ включались 3 последних показателя уровня глюкозы плазмы натощак (после 8 часов отсутствия потребления калорий) и через 2 ч после начала употребления пищи в день оценки гликемии натощак (постпрандиальная гликемия). Оценивалась частота гипогликемических эпизодов, под которыми подразумевалось снижение уровня глюкозы плазмы  $\leq 3.9$  ммоль/л и/или наличие характерной клинической картины вне зависимости от документирования уровня глюкозы [108].

У испытуемых контрольной группы была получена информация о наличии хронических заболеваний, постоянной медикаментозной терапии, вредных привычках.

Участники с гипертонической болезнью и другими сердечно-сосудистыми заболеваниями (перенесённые в прошлом инфаркт миокарда и/или острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), клинические варианты ишемической болезни сердца (ИБС), нарушения сердечного ритма, проявления экстракоронарного атеросклероза) продолжили получать ранее назначенную соответствующую антигипертензивную, гиполипидемическую, дезагрегантную и антиаритмическую терапию.

### **2.2.3 Инструментальные методы обследования**

Производилось измерение АД с помощью тонометра Omron M3 Expert (Япония) после 5 минут отдыха трижды с 10-минутным интервалом. В анализ включалось среднее значение. Осуществлялось измерение роста при помощи ростомера РМ-1 «Диакомс». Масса тела измерялась на медицинских электронных весах ВЭМ-150-«Масса-К» однократно с точностью до 100 г.

Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывался по формуле Кетле как отношение массы тела (в килограммах) к росту (в метрах), возведенному в квадрат.

Пациентам проводили стандартное исследование неврологического статуса с использованием камертона, неврологической иглы, монофиламента, тестера термочувствительности кожи, выполнялась ортостатическая проба. При отсутствии данных о состоянии глазного дна за последние 6 месяцев проводилась общепринятая офтальмологическая диагностика [1].

Недиабетический генез ХБП у пациентов с повышенными значениями альбуминурии исключался путём выполнения ультразвукового исследования (УЗИ) почек, ультразвукового дуплексного сканирования почечных артерий, выполнением микроскопии осадка и бактериологического посева мочи. По показаниям выполнялось УЗИ предстательной железы.

#### **2.2.4 Лабораторные методы обследования**

##### **Определяемые показатели мочи**

Всем участникам исследования были даны рекомендации по соблюдению прежнего водно-солевого режима, режима питания и физической активности, исключающего интенсивные физические нагрузки за 3 дня до сдачи анализов. После рекомендованного гигиенического туалета наружных половых органов осуществлялся сбор средней порции мочи при первом утреннем мочеиспускании в стерильный пластиковый контейнер. После отстаивания в течение 4 часов моча для определения коллагена IV типа добавлялась в пробирку со стабилизирующим буфером (Argutus Medical, Ирландия), а затем замораживалась при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Оставшаяся моча центрифугировалась при 800 g в течение 10 мин и хранилась при  $-70^{\circ}\text{C}$ .



Коллаген IV типа определялся с использованием коммерческого набора Argutus Medical (Ирландия). Иммуноферментный анализ выполнялся на универсальном автоматическом фотометре для микропланшет ELx800 (США).

После размораживания мочи в ней определяли концентрацию креатинина, альбумина, NGAL, L-FABP. Креатинин определялся энзиматическим методом, альбумин в моче – методом иммунотурбидиметрии на биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, США) с использованием соответствующих коммерческих наборов Cobas Integra, Roche (Германия). Уровень NGAL определялся количественным иммуно-хемилюминисцентным методом на анализаторе Architect i2000 и с использованием коммерческого набора фирмы Abbott Laboratories, США. Уровень L-FABP определялся с использованием ИФА-набора фирмы Hycult Biotech (Нидерланды).

Уровень мочевых маркеров определялся дважды с интервалом в 3-5 дней для минимизации внутрииндивидуальных вариаций [106]. Рассчитывалось соотношение маркеров к креатинину мочи (Кр. мочи). Таким образом, на первом визите определялись уровни АКС, коллагена IV типа/Кр. мочи, L-FABP/Кр. мочи и NGAL/Кр. мочи. Повторное определение маркеров осуществлялось через 6 месяцев.

### **Определяемые показатели крови**

Пациентам с СД 2 типа были даны рекомендации по ежедневному фиксированию гликемии натощак и через 2 ч после еды (на глюкометре Accu-Check Active фирмы Roche Diagnostics (Швейцария). В анализ включались среднее значение 3 последних показателей гликемии натощак и постпрандиальной гликемии.

Забор крови из локтевой вены осуществлялся натощак в утренние часы на первом визите и по окончании исследования через 6 месяцев. Для получения сыворотки кровь оставляли при комнатной температуре на 15 мин, затем пастеровской пипеткой отделяли сгусток от стенок пробирки и центрифугировали 10 мин при 3000 оборотах/мин. Получившуюся сыворотку хранили при -70 °С. После размораживания производили определение в

сыворотке креатинина, мочевины, общего холестерина, триглицеридов, цистатина С на биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, США) с использованием соответствующих коммерческих наборов Cobas Integra, Roche (Германия). Гликированный гемоглобин определялся в незамороженной цельной крови, собранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА-К2, на высокоэффективном жидкостном хроматографе Bio Rad d10 (США).

Уровень креатинина определялся энзиматическим методом, стандартизованным относительно референсного интервала масс-спектрометрии с изотопным разбавлением [61]. СКФ рассчитывалась по формулам, предложенным группой учёных, сотрудничающих в области эпидемиологии хронических заболеваний почек (СКД-ЕPI) на основании определения креатинина (рСКФкр), цистатина С в сыворотке (рСКФцис), а также обоих этих показателей (рСКФкр-цис) [61, 124].

### **2.3 Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка данных и построение графиков производились с использованием пакетов статистических программ SPSS 20.0 (SPSS Inc., США), Statistica 6.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., США). Для сравнения распределения качественных признаков использовался критерий хи-квадрат. В случае, когда равенство дисперсий не предполагалось, при сравнении переменных в независимых выборках применялись U-критерий Манна-Уитни (при сравнении 2 групп), однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса (при сравнении более 2 групп) с post-hoc-тестом Данна; для зависимых выборок использовался критерий Уилкоксона. В случае, когда предполагалось равенство дисперсий, при сравнении переменных в независимых выборках применялись t-критерий Стьюдента (при сравнении 2 групп), однофакторный дисперсионный анализ с post-hoc-тестом Тьюки (при сравнении

более 2 групп). Для зависимых выборок использовался t-тест для связанных показателей и one-way ANOVA с повторными измерениями. С помощью расчёта размера выборки и мощности было установлено, что 22 пациента в группе по окончании исследования обеспечат 80%-ю мощность для демонстрации гипоальбуминемического эффекта при истинной разнице в 15%, при условии, что внутрииндивидуальная разница в уровне альбуминурии составила в среднем 10%. Связь количественных переменных оценивалась с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена; связь количественных переменных с количественными и номинальными - в линейном и множественном регрессионном анализе с принудительным и пошаговым включением переменных. Использовали анализ классификаций с применением ROC-кривых для расчёта оптимального порога отсечения для уровня маркеров повреждения почек. Переменные с отличным от нормального распределением перед включением в многофакторные модели подвергали логарифмированию. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

### Глава 3

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Модель экспериментальной диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа у крыс

#### 3.1.1 Показатели гликемии и стабильность метаболических нарушений при развитии экспериментального сахарного диабета 2 типа у крыс

Масса тела крыс до выполнения правосторонней нефрэктомии варьировала от 180 до 210 г и составила  $200,0 \pm 11,8$  г у крыс, которые через 3 недели были переведены на высокожировое питание, и  $199,7 \pm 13,3$  г у крыс, продолживших получать стандартный корм ( $p=0,9$ ). Показатели массы тела и глюкозы плазмы крови натошак до начала высокожирового питания были сопоставимы в сравниваемых группах: в группе СД 2 –  $235,4 \pm 17,0$  г и  $4,6 \pm 1,1$  ммоль/л, а в контрольной группе без СД 2 –  $229,7 \pm 18,3$  г и  $4,3 \pm 0,6$  ммоль/л,  $p=0,37$  и  $p=0,76$ , соответственно. Получаемое с 3 по 8 неделю высокожировое питание привело к её незначимому повышению относительно контрольной группы геминефрэктомированных крыс, всё время находившихся на стандартном лабораторном рационе (Рисунок 3(а)). 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),  $p=0,02$  (Рисунок 3(б)).

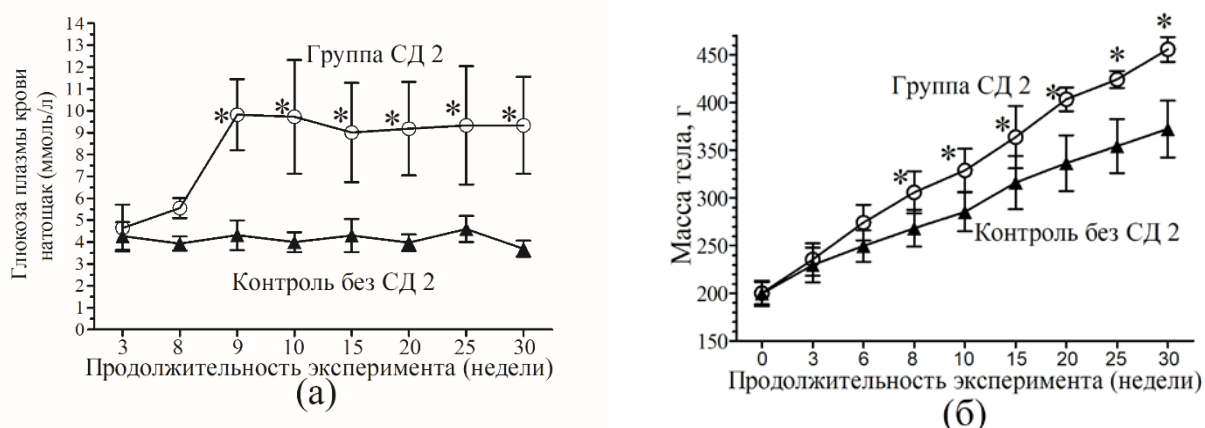


Рисунок 3 – Уровень глюкозы плазмы крови натошак (а) и массы тела (б) на протяжении хронического эксперимента в сравниваемых группах крыс

Примечание – \* –  $p < 0,05$  в каждой временной точке.

На Рисунке 4 представлены результаты глюкозотолерантного теста, выполненного через 1 неделю после внутрибрюшинного последовательного введения никотинамида (НА) и стрептозотоцина (СТЗ) 35 крысам основной группы (группа СД 2) или их растворителей 10 крысам контрольной группы (контроль без СД 2). У 10% животных после введения НА-СТЗ развилась выраженная гипергликемия (выше 20,0 ммоль/л), в связи с чем они были выведены из эксперимента. У 20% крыс на фоне введения НА и СТЗ уровень гликемии при проведении глюкозотолерантного теста не достигал пороговых значений, характерных для СД. Во всех оцененных временных точках (0, 30, 60 и 120 мин) отмечалась значимая разница в показателях гликемии между двумя сравниваемыми группами ( $p < 0,01$ ), что отражено на Рисунке 4(а). Последующий расчёт площади под кривой глюкозы (Рисунок 4(б)) подтвердил развитие СД 2 типа, согласно описанным выше критериям Peterson G. et al. (2015), у 70 % крыс [60]. Глюкоза крови у крыс основной группы, которым вводились НА и СТЗ, оставалась стабильно повышенной вплоть до окончания эксперимента на 30 неделе (Рисунок 3(а)). Случаев летального исхода на протяжении эксперимента зафиксировано не было.

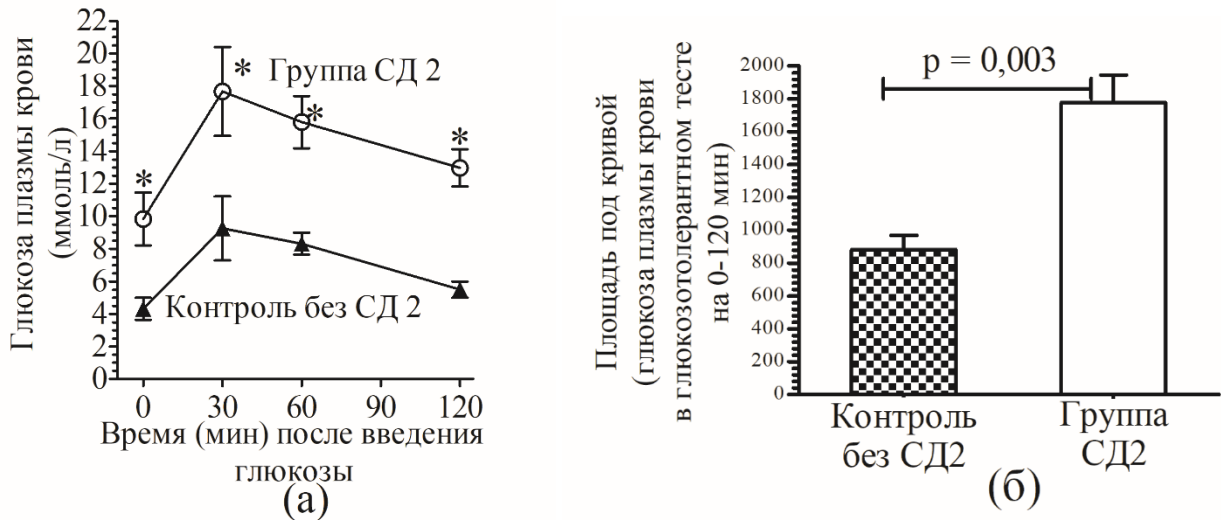


Рисунок 4 – Результаты проведения орального глюкозотолерантного теста в экспериментальных группах крыс

Примечание – (а) Кривые глюкозы крови, построенные по результатам проведения глюкозотолерантного теста в экспериментальных группах. \* –  $p < 0,01$  в каждой временной точке. (б) Общая площадь под кривой (AUC) по результатам глюкозотолерантного теста.

В Таблице 1 отражены изменения метаболических показателей, оцененных в ходе хронического эксперимента. Начиная с 3-й недели высокожирового питания крысы стали неохотно употреблять предлагаемый им корм с говяжьим салом, полностью отказавшись от него по окончании 5 недель. Тем не менее, вплоть до завершения исследования на 30-й неделе у крыс группы СД 2 отмечались значимо более высокие значения массы тела (Рисунок 3(б) и Таблица 1), общего холестерина и триглицеридов по сравнению с крысами контрольной группы (Таблица 1). Помимо повышения глюкозы крови, на протяжении 20 недель после введения НА и СТЗ сохранялись стабильными другие метаболические нарушения (повышение уровня HbA1c и индекса HOMA-IR, умеренно сниженный уровень инсулина в плазме крови натощак) без тенденции к нормализации к окончанию эксперимента (Таблица 1).

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

Экспериментальные группы	Контроль без СД 2			Группа СД 2		
	Среднее значение ± стандартное отклонение					
Оцениваемый показатель в динамике (по неделям)	10 нед	20 нед	30 нед	10 нед	20 нед	30 нед
Масса тела, г	285,4 20,5	336,5 29,2	372,3 29,8	328,9 22,7**	403,4 12,4***	455,6 13,0**
НЬА1с, %	3,7 0,29	3,7 0,13	4,0 0,26	5,4 0,34*	7,0 0,29*	6,9 0,27*
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	3,7 0,39	3,8 0,47	3,7 0,36	9,7 2,60**	9,2 2,14**	9,3 2,22*
Инсулин крови, пмоль/л	83,5 6,81	96,6 9,18	87,8 6,24	49,6 7,34*	51,3 8,72**	50,9 8,85*
НОМА-IR	1,93 0,29	2,23 0,14	2,01 0,22	3,20 0,39*	2,87 0,22*	2,91 0,70*
Общий холестерин, ммоль/л	1,55 0,35	1,58 0,19	1,63 0,27	2,89 0,25*	2,76 0,23*	2,74 0,21**
Триглицериды, ммоль/л	0,57 0,08	0,56 0,12	0,70 0,17	1,05 0,18*	0,90 0,12*	0,89 0,19*

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

### 3.1.2 Лабораторные изменения, характеризующие развитие диабетической нефропатии у крыс

Через 2 недели после введения НА и СТЗ показатели сывороточного креатинина и экскреции альбумина с мочой незначимо превосходили соответствующие средние значения у крыс без СД 2 типа (Таблица 2). Лабораторные признаки формирования нарушения почечной функции в группе

СД 2 в виде значимого повышения креатинина сыворотки и альбуминурии были зафиксированы к 20 неделе исследования. В этот период суточная экскреция альбумина с мочой почти в 10 раз превышала средний уровень у крыс контрольной группы и показатели, оцененные на 10-й неделе. Выявленные почечные нарушения усугубились к окончанию эксперимента на 30 неделе, когда снижение клиренса креатинина достигло значимого уровня ( $p=0,02$ ), а суточная экскреция альбумина с мочой увеличилась более чем в 40 раз ( $p=0,002$ ) по сравнению с первоначальным измерением на 10-й неделе (Таблица 2). По окончании исследования в группе СД 2 по сравнению с крысами контрольной группы зафиксирован значимо более низкий клиренс креатинина и близкое к значимому повышение мочевины сыворотки (Таблица 2). На протяжении эксперимента в группе контроль без СД 2 отмечалась тенденция к повышению клиренса креатинина и увеличению экскреции альбумина (Таблица 2).

Таблица 2 – Изменения показателей функции почек на протяжении эксперимента у крыс с СД 2 и крыс контрольной группы без СД 2 типа

Экспериментальные группы	Контроль без СД 2			Группа СД 2		
	Среднее значение ± среднеквадратичное отклонение					
	10 нед	20 нед	30 нед	10 нед	20 нед	30 нед
Оцениваемый показатель в динамике (по неделям)						
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	33,5	35,8	41,9	38,3	47,0	69,0
p versus Контроль без СД 2	3,4	3,6	4,1	3,0	4,0	4,3*
	–	–	–	0,14	0,004	0,002
Клиренс креатинина, мл/мин/кг	1,11	1,15	1,28	1,57	1,35	0,89
p versus Контроль без СД 2	0,18	0,06	0,38	0,37	0,42	0,10*
	–	–	–	0,11	0,69	0,01
Альбумин мочи, мкг/24 ч	30,4	35,7	71,4	52,1	478,4	2263,8
	11,6	9,9	26,4*	17,6	63,3*	394,5*



p versus Контроль без СД 2	–	–	–	0,11	0,002	0,002
Мочевина,	н/о	н/о	6,5	н/о	н/о	8,82
ммоль/л			0,89			1,03
p versus Контроль без СД 2	–	–	–	–	–	0,06
Примечание – н/о – не оценивалось. * – $p < 0,05$ в сравнении со значением параметра в этой же группе на 10-й неделе эксперимента. – – непригодно для сравнения.						

### 3.1.3 Морфологические изменения, характеризующие развитие диабетической нефропатии у крыс

Результаты морфологического исследования почечной ткани крыс в обеих сравниваемых группах и выполненный морфометрический анализ подтвердили формирование у крыс в группе СД 2 специфических признаков, характерных для экспериментальной ДН (Таблица 3) [178, 184]. Так, у крыс основной группы значения рассчитанных полуколичественным методом индексов гломерулосклероза и тубулоинтерстициального фиброза более чем в 4 раза превышали показатели в контрольной группе (Таблица 3). Разница в показателях толщины ГБМ также являлась высокозначимой ( $p=0,002$ ).

Таблица 3. Данные морфометрического анализа по результатам световой и электронной микроскопии почечной ткани по окончании эксперимента в контрольной группе без СД 2 и у крыс с СД 2 типа

Морфометрический показатель	Экспериментальные группы	
	Контроль без СД 2	Группа СД 2
Индекс гломерулосклероза, произвольные единицы (ШИК-окраска)	0,11±0,08	0,52±0,11*

Индекс тубулоинтерстициального фиброза, произвольные единицы (ШИК-окраска)	0,2±0,16	0,88±0,23*
Толщина гломерулярной базальной мембраны, нм	189,7±14,8	305,3±60,4*
Примечание – * – p<0,001 в сравнении с группой контроль без СД 2.		

### **3.2 Оценка влияния в хроническом эксперименте метформина и вилдаглиптина на структурно-функциональное состояние почек крыс с сахарным диабетом 2 типа**

#### **3.2.1 Показатели углеводного обмена и метаболические параметры в сравниваемых экспериментальных группах**

В Таблице 4 представлены данные оценки показателей углеводного обмена и метаболического статуса в контрольных группах крыс (с СД 2 и без СД 2) и крыс с СД 2 типа на фоне терапии метформином или вилдаглиптином, оцененные по окончании исследования на 30-й неделе. Масса тела, показатели глюкозы плазмы крови натощак крови и HbA1c, показатели липидограммы и рассчитанные индексы инсулинорезистентности НОМА-IR у крыс с СД 2 типа как в контрольной группе, так и в группах назначения исследуемых препаратов, были выше по сравнению с крысами контрольной группы без СД 2 типа, которые не получали высокожировое питание. На фоне терапии метформином и вилдаглиптином все эти показатели, за исключением триглицеридов сыворотки, были заметно ниже чем в контрольной группе крыс с СД 2. При этом на терапии вилдаглиптином глюкоза крови была наименьшей в сравнении с двумя другими

группами крыс с СД 2, но снижение уровня HbA1c при этом не достигло статистической значимости (Таблица 4).

Таблица 4 – Показатели гликемии и метаболического статуса по окончании эксперимента в сравниваемых группах крыс

Показатель	Сравниваемые группы крыс				Р для всех 4 групп
	Контроль без СД 2	СД 2 (контроль)	СД 2 (вилда глиптин)	СД 2 (метформин)	
Масса тела, г	372,3±29,8 ###	455,6±13,0 ***	452,5±14,3 ***	432,0±12,9 **#	<0,001
HbA1c, %	4,0±0,3###	6,9±0,3***	6,6±0,51***	6,7±0,7***	<0,001
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	3,7±0,4###	9,3±2,2***	7,3±0,9***#	7,6±0,8***	<0,001
НОМА-IR	2,0±0,2#	2,9±0,7*	2,4±0,5	2,2±0,5	0,052
Общий холестерин, ммоль/л	1,6±0,3##	2,7±0,2**	2,6±0,7**	2,1±0,7	0,002
Триглицериды, ммоль/л	0,7±0,2	0,9±0,2	1,1±0,8*	0,8±0,4	0,47
Примечание – Результаты попарного сравнения: * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 в сравнении с группой Контроль (без СД 2); # – p<0,05, ## – p<0,01, ### – p<0,001 в сравнении с группой СД 2 (контроль). Значения p≥0,05 при сравнении между группами СД 2 (вилдаглиптин) и СД 2 (метформин) не показаны.					

### 3.2.2 Рутинные показатели и биомаркеры повреждения почек в сравниваемых экспериментальных группах

По окончании исследования креатинин сыворотки, уровни мочевины сыворотки и экскреции альбумина с мочой за 24 часа у крыс всех групп с СД 2 типа значимо (за исключением мочевины) были повышены по сравнению с животными контрольной группы без СД 2 типа, свидетельствуя о наличии

почечной диабетической дисфункции (Рисунки 5(а), 5(б), 5(в), 5(г), соответственно).

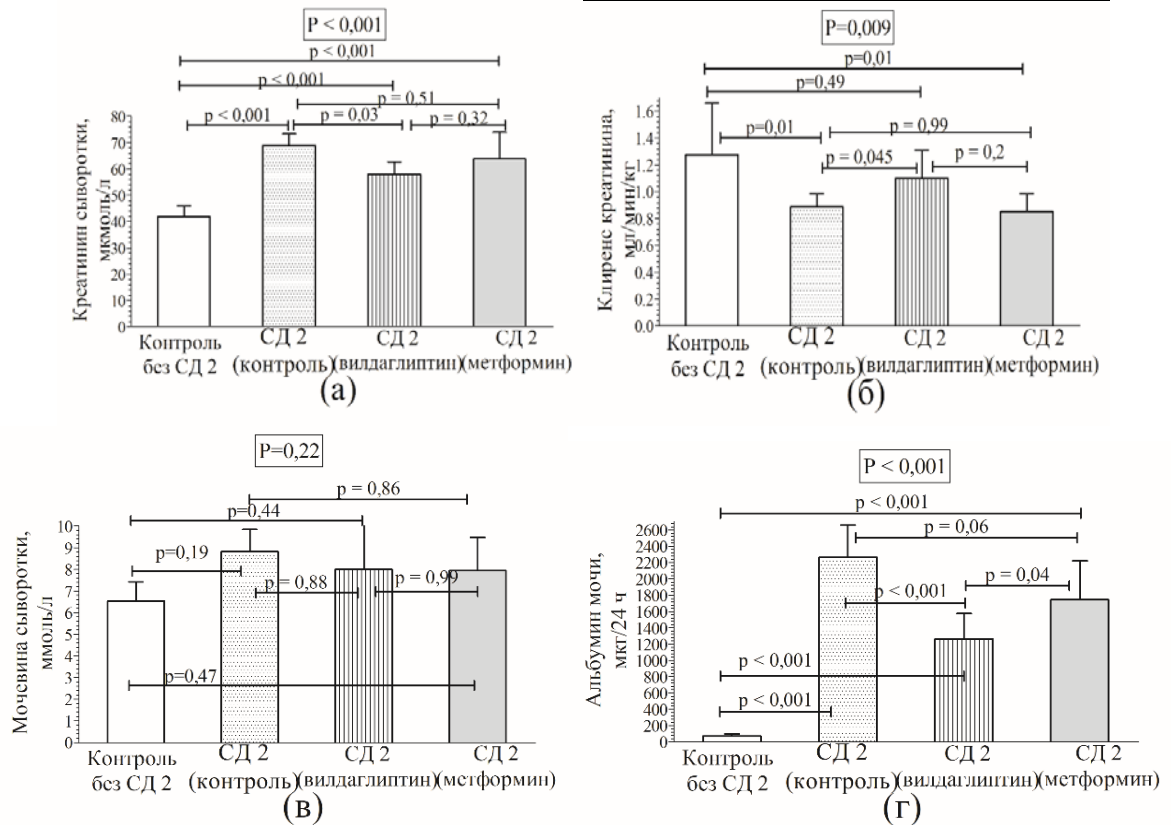


Рисунок 5 – Уровень рутинных маркеров поражения почек в сравниваемых группах крыс по окончании эксперимента: креатинин сыворотки (а), клиренс креатинина (б), мочевина сыворотки (в) и суточная экскреция альбумина (г)

Примечание –  $p$  – результаты сравнения одновременно в 4 группах.  $p$  – результаты попарного сравнения.

В группах крыс с СД 2 типа, получавших лечение ССП, уровни креатинина и мочевины сыворотки, а также суточной альбуминурии были ниже по сравнению с контрольными животными с СД 2 (Рисунок 5(а) и 5(в), 5(г), соответственно). Однако только в группе СД 2 (вилдаглиптин) снижение креатинина сыворотки было статистически значимым –  $58,0 \pm 4,7$  мкмоль/л versus  $69,0 \pm 4,3$  мкмоль/л в группе СД 2 (контроль),  $p=0,03$ . Это сопровождалось более высокой величиной клиренса креатинина в сравнении с крысами с СД 2 типа, не получавшими

препарат ( $1,10 \pm 0,21$  мл/мин/кг versus  $0,89 \pm 0,10$  мл/мин/кг, соответственно,  $p=0,045$ ). При этом значения клиренса креатинина в группе СД 2 (вилдаглиптин) были близкими к показателям в группе крыс без СД 2 ( $1,28 \pm 0,39$  мл/мин/кг,  $p=0,45$ ), Рисунок 5(б). Кроме того, в группе СД 2 (вилдаглиптин) снижение экскреции альбумина с мочой было статистически значимым как в сравнении с контрольной группой (СД 2) ( $1262,9 \pm 311,6$  versus  $2263,8 \pm 394,5$  мкг/24 ч,  $p < 0,001$ ), так и с группой крыс, получавших метформин ( $1743,5 \pm 476,5$  мкг/24 ч,  $p=0,04$ ), Рисунок 5(г).

Оцененные по окончании исследования маркеры канальцевого повреждения NGAL и KIM-1 в моче более чем в 5 раз были повышены у крыс всех групп с СД 2 типа по сравнению с крысами группы контроля без СД 2 (Рисунок 6(а) и 6(б), соответственно). На фоне терапии исследуемыми препаратами произошло снижение суточной экскреции обоих маркеров канальцевого повреждения по сравнению с крысами контрольной группы с СД 2. Однако только в группе СД 2 (метформин) разница с контрольной группой (СД 2) была значимой как для мочевого NGAL ( $1319,7 \pm 213,0$  versus  $1861,8 \pm 660,8$  нг/24 ч,  $p=0,03$ , Рисунок 6(а) , так и для KIM-1 ( $3,54 \pm 1,17$  versus  $6,29 \pm 1,76$  нг/24 ч,  $p < 0,001$ , Рисунок 6(б)).

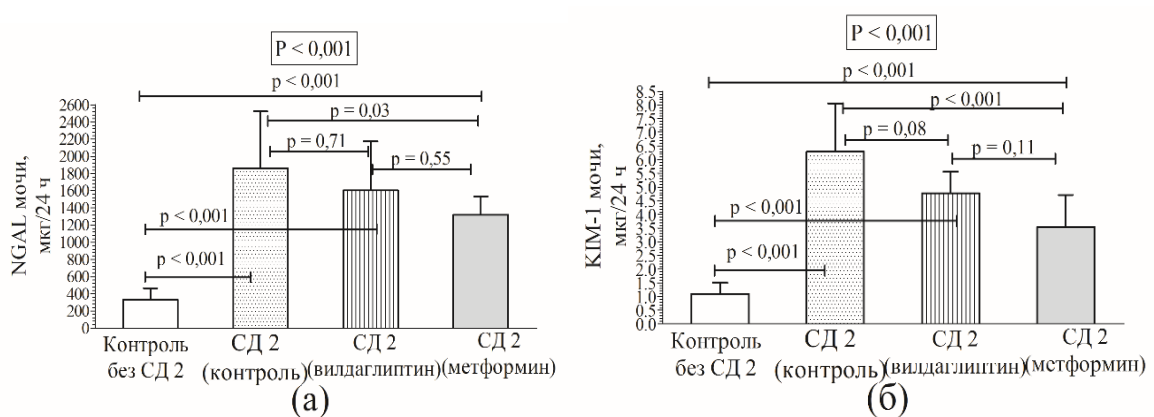


Рисунок 6 – Уровень экскреции с мочой NGAL (а) и KIM-1 (б) в сравниваемых группах крыс по окончании исследования

Примечание –  $\boxed{P}$  – результаты сравнения одновременно в 4 группах. p – результаты попарного сравнения.

### 3.2.3 Морфологические почечные изменения в сравниваемых экспериментальных группах

Морфометрический анализ, выполненный по окончании исследования по результатам электронной и светооптической микроскопии почечной ткани, выявил уменьшение клубочковых проявлений ДН в обеих группах крыс с СД 2, получавших сахароснижающую терапию, по сравнению с крысами контрольной группы с СД 2 (Рисунки 7-8).

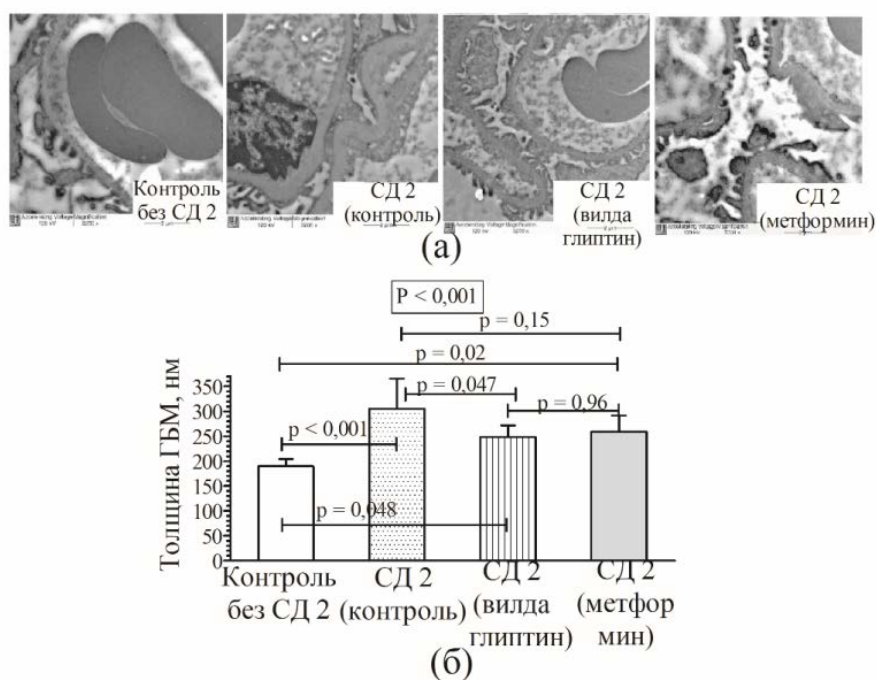


Рисунок 7 – Результаты трансмиссионной электронной микроскопии почечной ткани в сравниваемых группах крыс по окончании эксперимента

Примечание – (а) Микрофотографии, увеличение  $\times 3200$ . (б) Результаты количественной оценки толщины гломерулярной базальной мембраны.  $\boxed{p}$  – результаты сравнения одновременно в 4 группах.  $p$  – результаты попарного сравнения.

Только в группе СД 2 (вилдаглиптин) значения толщины ГБМ (Рисунок 7) и индекса мезангиальной экспансии (Рисунок 8) были статистически значимо

ниже по сравнению с показателями контрольной группы крыс с диабетом ( $248,6 \pm 23,4$  нм versus  $305,3 \pm 60,4$  нм,  $p=0,047$  и  $1,4 \pm 0,20$  versus  $2,0 \pm 0,17$  произвольных единиц,  $p < 0,001$ , соответственно). В клубочках почек крыс с СД 2 отмечались гломеруломегалия, гиперклеточность, неравномерное утолщение стенок капилляров с участками сращения их петель с капсулой Шумлянско-Боумена (Рисунок 8).

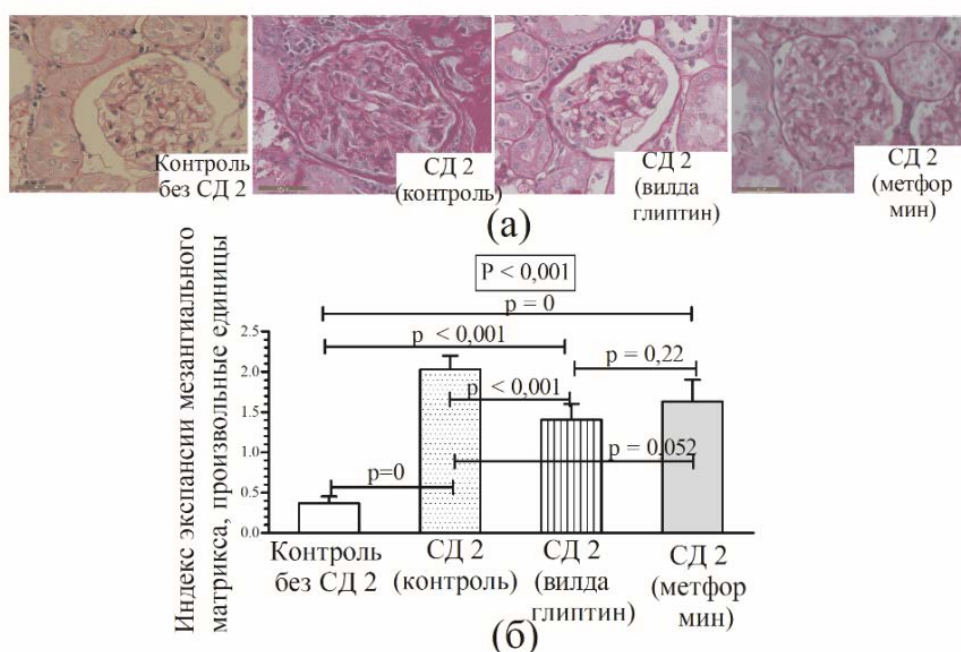


Рисунок 8 – Экспансия мезангиального матрикса в клубочках почек в сравниваемых группах крыс по окончании эксперимента

Примечание – (а) Микрофотографии. ШИК-окраска, увеличение  $\times 640$ . (б) Рассчитанный индекс экспансии мезангиального матрикса.  $\boxed{p}$  – результаты сравнения одновременно в 4 группах.  $p$  – результаты попарного сравнения.

Ни в одном из просмотренных клубочков не выявлено развитие полного их фиброза с окклюзией (что соответствовало условным баллам «3» и «4») или формирование узелков Киммельстилл-Уилсона, характерных, как правило, для поздних морфологических стадий ДН у пациентов с СД, сопровождающихся постоянной протеинурией [42, 159]. В контрольной группе крыс без СД 2 также

выявлялись клубочки с начальными склеротическими изменениями (балл «1»), однако, они были единичными. Индекс гломерулосклероза был ниже в группах крыс с СД 2, получавших лечение ( $0,49 \pm 1,17$  произвольных единиц в группе СД 2 (метформин) и  $0,41 \pm 0,12$  – в группе СД 2 (вилдаглиптин), однако разница с группой СД 2 (контроль) оказалась статистически незначимой ( $0,52 \pm 0,11$ ),  $p=0,99$  и  $p=0,55$ , соответственно).

Тубулоинтерстициальные диабетические изменения отмечались во всех 3 группах крыс с СД 2 типа (Рисунок 9). Нами не было выявлено статистически значимой разницы в величинах рассчитанного полуколичественным методом индекса тубулоинтерстициального фиброза в этих группах (Рисунок 9), однако обращало на себя внимание снижение этого индекса в группе терапии метформином ( $0,73 \pm 0,33$  versus  $0,89 \pm 0,23$  произвольных единицы в группе СД 2 (контроль),  $p=0,33$ ), тогда как в группе СД 2 (вилдаглиптин) этот показатель был сопоставим с группой СД 2 (контроль) ( $0,90 \pm 0,16$  произвольных единиц,  $p=0,99$ ).

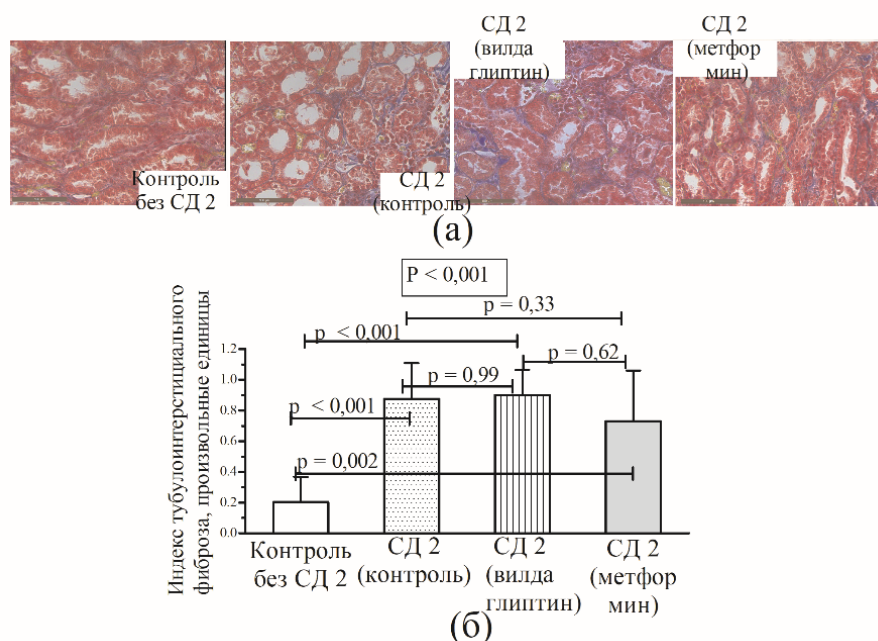


Рисунок 9 – Тубулоинтерстициальный фиброз почечной ткани крыс в сравниваемых экспериментальных группах

Примечание – (а) Микрофотографии. Трихромное окрашивание по Массону, увеличение  $\times 200$ . (б) Рассчитанный индекс тубулоинтерстициального фиброза.  $\boxed{P}$  – результаты сравнения одновременно в 4 группах.  $p$  – результаты попарного сравнения.



### 3.3 Заключение к Главе 3

Таким образом, интервальное внутрибрюшинное введение НА (230 мг/кг) и СТЗ (65 мг/кг) половозрелым геминефрэктомированным крысам стока Wistar, получавшим предварительно в течение 5 недель высокожировое питание с говяжьим салом, способствовало развитию экспериментального СД 2 типа с умеренными метаболическими нарушениями. При этом невыраженная гипергликемия, увеличенная масса тела, инсулинорезистентность и дислипидемия, сохранявшиеся стабильными до окончания эксперимента, приводили к развитию на 30-й неделе почечных функциональных (альбуминурия, снижение клиренса креатинина) и морфологических нарушений (значимое утолщение ГБМ и экспансия мезангиального матрикса с начальными признаками гломерулосклероза и тубулоинтерстициального фиброза), характерных для ранних стадий ДН.

Ежедневное добавление в течение 10 недель с питьевой водой вилдаглиптина (8 мг/кг) таким крысам, помимо умеренного сахароснижающего эффекта, приводило к значимому снижению альбуминурии, ассоциированному с улучшением фильтрационной функции почек, и значимому ослаблению клубочковых морфологических изменений (мезангиальной экспансии и утолщения гломерулярной базальной мембраны) по сравнению с крысами с СД 2 типа контрольной группы. При этом добавление метформина (300 мг/кг) крысам с экспериментальным СД 2 типа способствовало умеренному ослаблению метаболических нарушений и почечных структурных изменений по сравнению с крысами контрольной группы с СД 2 типа и сопровождалось значимо меньшей экскрецией с мочой маркеров канальцевого повреждения NGAL и KIM-1.

## Глава 4

### РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЧАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 4.1 Сравнение экскреции маркеров повреждения почек у больных сахарным диабетом 2 типа и лиц без диабета, взаимосвязь с альбуминурией и расчётной скоростью клубочковой фильтрации

##### 4.1.1 Характеристика обследованных больных сахарным диабетом 2 типа и участников контрольной группы без диабета

Лабораторные исследования были выполнены у 81 мужчины и женщины из 84 включённых больных СД 2 типа. В контрольной группе добровольцев без СД 2 типа в анализ были включены данные всех 26 мужчин и женщин.

В Таблице 5 представлена основная характеристика обследованных участников. Сравнимые группы были сопоставимы по поло-возрастному признаку. Средний возраст испытуемых обеих групп составил около 60 лет, подавляющее большинство среди них были женщины. Продолжительность СД 2 типа (с момента постановки на учёт эндокринолога) была не меньше  $10,7 \pm 4,4$  лет. У большей части обследованных больных инсулинотерапия была представлена базальными инсулинами гларгин (45,7%), детемир (21,0%), изофан-инсулином (13,6%). Для болюсного введения в 56,8% случаев применялись аналоги инсулина ультракороткого действия или инсулины короткого действия (16,0%). Кроме того, 19,8% пациентов применяли комбинированные бифазные инсулины.

У половины больных СД 2 типа имелась ДН в стадии умеренно повышенной альбуминурии (ХБП А2). Это значимо отразилось на рутинных маркерах поражения почек: больные СД 2 типа имели более низкие показатели рСКФкр и альбуминурию, более чем в 8 раз превышающую уровни контрольной группы.

Подавляющее число испытуемых имели избыточную массу тела или ожирение. Показатели липидограммы и системного АД значимо не различались между группами. При этом пациенты с СД 2 типа в 2 раза чаще получали ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ) или блокаторы рецепторов ангиотензина II (БРА) в качестве монотерапии или в комбинации с другими группами антигипертензивных препаратов.

Таблица 5 – Характеристика обследованных больных СД 2 типа и участников контрольной группы без СД 2 типа

Показатель	Контрольная группа n=26	Больные СД 2 типа n=81	p
Возраст (годы)	59,1±5,7	61,1±5,4	0,09
Мужской пол, n (%)	10 (38,5%)	34 (42,0%)	0,75
НbA1c, %	5,4±0,4	7,2±0,5	<0,001
ДН (ХБП А2), n (%)	–	41 (50,6%)	–
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	30,7±3,1	32,0±3,2	0,16
Общий холестерин, ммоль/л	5,6±0,8	5,5±0,8	0,95
Триглицериды, ммоль/л	1,7±0,8	1,7±0,9	0,79
Систолическое АД, мм рт. ст.	136,5±10,8	133,7±9,3	0,20
Диастолическое АД, мм рт. ст.	81,4±7,9	80,7±7,3	0,71
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	72,0±12,6	82,0±13,3	0,001
pСКФкр (СКД ЕРІ), мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	88,1±10,7	76,8±13,6	<0,001
Альбумин-креатининовое соотношение (АКС), мг/г Кр. Среднее ± стандартное отклонение Медиана [25%; 75%]	7,6±5,5 6,0 [4,2;9,1]	64,1±79,0 29,6 [17,3;63,2]	<0,001
Приём ингибиторов АПФ/ БРА, n (%)	9 (34,6%)	61 (75,3%)	<0,001
Анамнез сердечно-сосудистых заболеваний, n (%)	12 (46,2%)	43 (53,1%)	0,38
Примечание – – оценка невозможна			

Несмотря на то, что сердечно-сосудистые заболевания почти в равной степени встречались в обеих группах, у больных СД 2 типа чаще отмечались более тяжёлые их клинические варианты (перенесённые в прошлом инфаркт

миокарда, ОНМК, нарушения сердечного ритма), а также их сочетания по сравнению с контрольной группой, где преобладали атеросклеротическое поражение брахиоцефальных артерий и артерий нижних конечностей без гемодинамически значимого стенозирования и стенокардия напряжения (Рисунок 10).

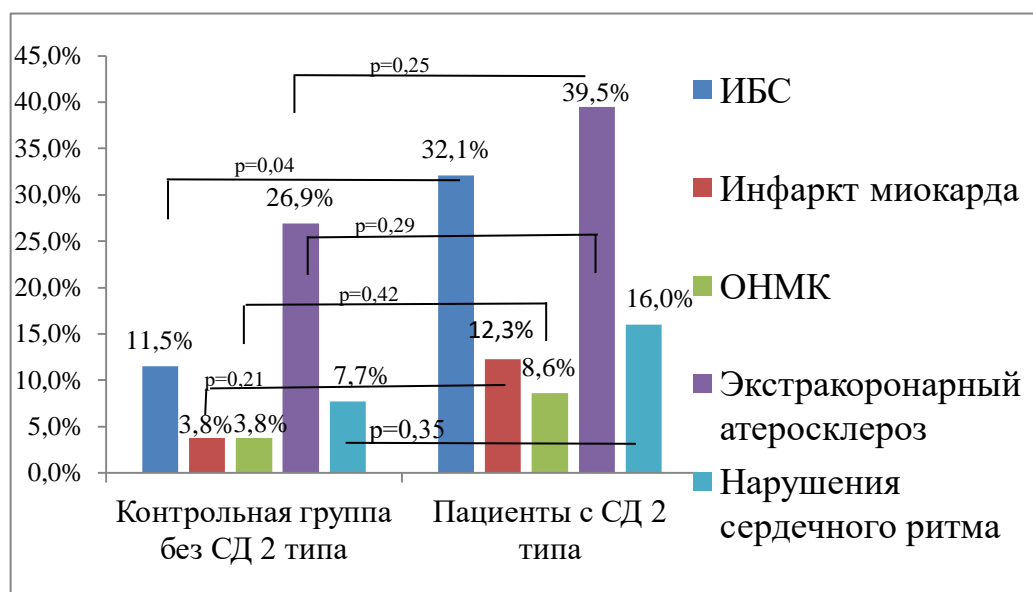


Рисунок 10 – Сравнение частоты развития сердечно-сосудистых заболеваний в группе больных СД 2 типа и в контрольной группе

#### 4.1.2 Характеристика обследованных больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от категории альбуминурии

На основании уровня экскреции альбумина больные СД 2 типа были разделены на 2 подгруппы:

1) группа с нормальной или незначительно повышенной альбуминурией (альбумин-креатининовое соотношение (АКС) до 30 мг/г Кр.) – группа СД 2 (без ДН), включавшая 40 пациентов;

2) группа с умеренно повышенной альбуминурией (АКС 30-300 мг/г Кр.) – группа СД 2 (ДН), включавшая 41 пациента.

При анализе данных тех же участников с учетом разделения больных СД 2 типа на 2 подгруппы в зависимости от категории альбуминурии было выявлено схожее распределение пациентов по поло-возрастному принципу, однако возраст пациентов, как и известная продолжительность СД 2 типа, были наибольшими в подгруппе «ДН» (Таблица 6). Больные СД 2 типа обеих групп, помимо ожидаемо более высоких значений HbA1c и показателей гликемии натощак, имели значимо более выраженную инсулинорезистентность по сравнению с участниками без СД 2 типа. Средний уровень HbA1c и суммарная суточная доза инсулина были значимо выше в группе «ДН». Тем не менее, уровни глюкозы крови натощак и постпрандиальной гликемии были статистически сопоставимы в сравниваемых подгруппах пациентов с СД 2 типа. Частота гипогликемий в этих группах также не различалась.

Показатели липидограммы (общий холестерин и триглицериды), систолического и диастолического АД значимо не различались как в группах пациентов с СД 2 типа, так и в сравнении с контролем (Таблица 6). Доля лиц, принимавших антигипертензивную терапию и гиполипидемические препараты (преимущественно статины), была выше в обеих группах больных СД 2. При этом пациенты группы «ДН» получали её значимо чаще. Курильщики с одинаковой частотой присутствовали во всех трёх группах. Частота развития сердечно-сосудистых заболеваний была выше в подгруппе пациентов с ДН. По окончании исследования всем больным с повышенной АКС, не получавшим блокаторы активности РААС, они были назначены при отсутствии противопоказаний.

Таблица 6 – Характеристика обследованных больных СД 2 типа в зависимости от категории альбуминурии в сравнении с контрольной группой участников без СД 2 типа

Показатель	Контроль ная группа n=26	Группа СД 2 (без ДН) n=40	Группа СД 2 (ДН) n=41	р для всех групп	р для 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, годы	н/о	8,7±4,0	12,6±4,1	–	<0,001
Суточная доза инсулина, единиц/кг/сутки	н/о	0,43±0,12	0,51±0,14	–	0,005
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	5,4±0,56	6,6±0,9*	6,8±1,4*	<0,001	0,45
Глюкоза крови постпрандиальная, ммоль/л	н/о	8,2±1,4	8,7±1,4	–	0,13
НbA1c, %	5,38±0,42	7,0±0,5*	7,3±0,5*	<0,001	0,04
Частота гипогликемических эпизодов (случаев в месяц)	н/о	1,2±1,1	1,3±0,9	–	0,47
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	30,7±3,1	31,6±3,3	32,3±3,1	0,12	0,31
Общий холестерин, ммоль/л	5,6±0,9	5,6±0,9	5,5±0,8	0,76	0,47
Триглицериды, ммоль/л	1,7±0,8	1,6±0,4	1,9±1,1	0,38	0,18
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
Диабетическая полинейропатия, n(%)	н/о	29 (72,5%)	39 (95,1%)	–	0,006
Диабетическая ретинопатия, n (%)	н/о	11 (27,5%)	26 (63,5%)	–	0,001
Гиполипидемическая терапия, n (%)	9 (34,6 %)	17 (42,5%)	28(68,3%)*	0,01	0,02
Антигипертензивная терапия, n (%)	18 (69,2%)	33(82,5%)	40(97,6%)*	0,006	0,02
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
Курение, n (%)	10 (38,5%)	10 (25,0%)	14 (34,1%)	0,47	0,37
Примечание – н/о – не оценивалось/оценка невозможна; – – непригодно для сравнения; * – p<0,05 versus контрольная группа. Значения p≥0,05 при попарном сравнении не показаны.					

### 4.1.3 Показатели почечной функции в контрольной группе и у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от категории альбуминурии

Показатели почечной функции в сравниваемых группах показаны в Таблице 7. Средний уровень АКС в группе пациентов без ДН был незначимо выше, чем в контрольной группе. Самый низкий средний уровень креатинина отмечался в контрольной группе и повышался по мере увеличения градации альбуминурии в группах пациентов с СД 2 типа. Соответственно, наименьшая рСКФкр зафиксирована у больных группы СД 2 «ДН». Средние показатели рСКФцис и рСКФкр-цис были выше в сравнении с определением СКФ на основании сывороточного креатинина. Экскреция всех исследуемых мочевых маркеров была выше у больных СД 2 типа в сравнении с лицами без СД 2 (Таблица 7).

Таблица 7 – Показатели почечной функции и маркеры повреждения почек у обследованных больных СД 2 типа в зависимости от категории альбуминурии в сравнении с контрольной группой

Показатель	Контрольная группа без СД 2 n=26	Группа СД2 (без ДН) АКС<30мг/г Кр., n=40	Группа СД2 (ДН) АКС 30-300 мг/г Кр., n=41	р для групп с СД 2 типа
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	72,0±12,6	78,1±11,6	85,8±13,9*	0,008
рСКФкр, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	88,1±10,7	80,4±13,2*	73,4±13,4**	0,02
Цистатин С сыворотки, мг/л	0,77±0,08	0,84±0,12*	0,93±0,13**	0,003
рСКФцис, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	101,5±8,3	93,0±14,5*	83,4±14,3**	0,004

рСКФкр-цис, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	95,9±8,5	84,4±18,8*	76,6±16,9**	0,08
АКС, мг/г Кр.	7,6±5,5	17,3±8,9	109,7±89,9**	<0,001
Коллаген IV типа/Кр. мочи, мкг/г Кр. Среднее ± СО 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]**	<0,0001
NGAL/Кр. мочи, мкг/г Кр. Среднее ± СО 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]**	0,01
L-FABP/ Кр. мочи, мкг/г Кр. Среднее ± СО 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]**	0,002
Примечание – СО – стандартное отклонение. * – p<0,05, **– p<0,01 versus контрольная группа без СД 2. Значения p≥0,05 при попарном сравнении не показаны.				

С учётом большого разброса полученных значений мочевых маркеров повреждения почек у участников разных подгрупп проводилось их логарифмирование (Рисунок 11(а-в)). Из представленных данных следует, что экскреция L-FABP/Кр. и NGAL/Кр. была значимо повышена у больных СД 2 типа в сравнении с контрольной группой даже при значениях АКС<30 мг/г Кр. (Рисунок 11(а) и 11(б), соответственно). Величина экскреции коллагена IV типа/Кр. при этом была сопоставима с показателями у участников без СД 2 типа (Рисунок 11(в)). С увеличением категории альбуминурии повышалась экскреция всех трёх маркеров. У больных СД 2 типа и ДН, по сравнению с больными с АКС<30 мг/г Кр., значимо были повышены Log(L-FABP/Кр.) и Log(коллаген IV/Кр.) (Рисунки 11(а) и 11(в), соответственно). Статистических различий в уровнях Log(NGAL/Кр.) между подгруппами пациентов с СД 2 типа не было обнаружено.



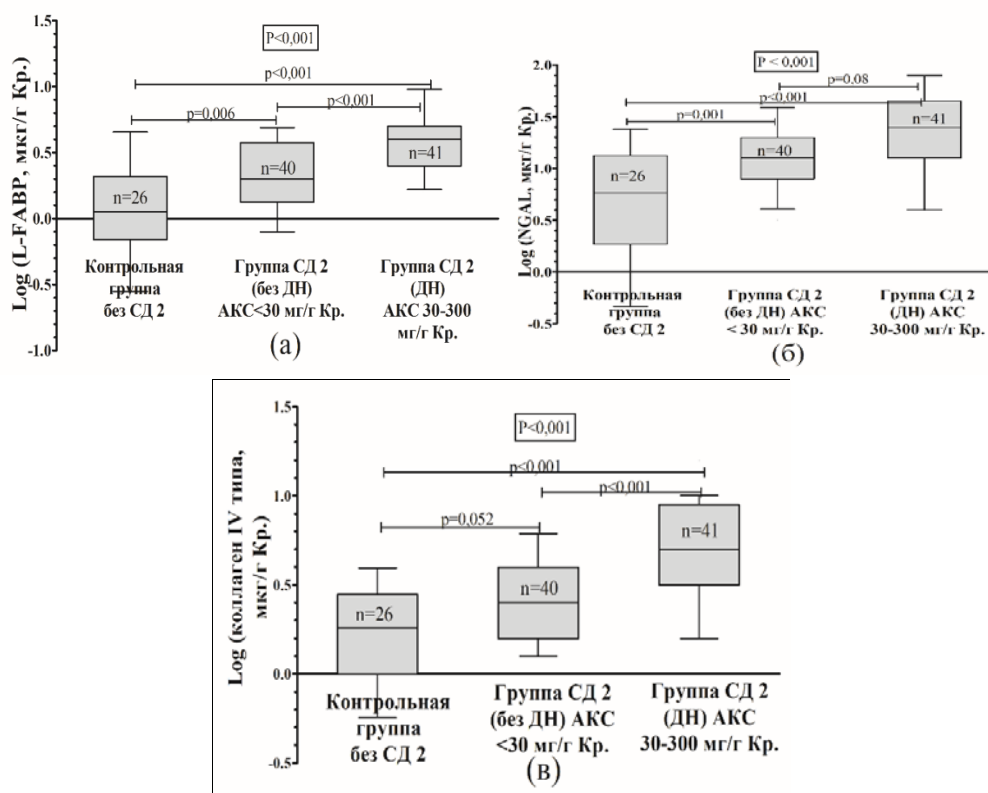


Рисунок 11 – Сравнение логарифмов величины экскреции L-FABP/Кр. (а), NGAL/Кр. (б) и коллагена IV/Кр. (в) в контрольной группе и у больных СД 2 типа в зависимости от категории альбуминурии

Примечание –  $\boxed{p}$  – результаты сравнения одновременно в 3 группах. p – результаты попарного сравнения. Результаты представлены в виде указания 25-го и 75-го перцентилей с медианой (центральная линия), планки погрешностей показывают 10-й и 90-й перцентили. Log – десятичный логарифм.

#### 4.1.4 Уровень маркеров повреждения почек в контрольной группе и у больных сахарным диабетом 2 типа при нормальной СКФ и при незначительном её снижении

На основании уровня рСКФкр больные СД 2 типа были разделены на 2 подгруппы: 1) незначительное снижение рСКФкр (60-89 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>), в которую вошла основная часть пациентов (62 человека); 2) пациенты с рСКФкр в

оптимальном диапазоне ( $\geq 90$  мл/мин/1,73м<sup>2</sup>), n=19. Участники контрольной группы аналогичным образом были разделены на 2 подгруппы (включавшей 12 и 14 человек, соответственно).

Как видно из Рисунков 12(а-в), по сравнению с участниками контрольной группы, больные СД 2 типа в оптимальном диапазоне рСКФкр характеризовались более высокими значениями логарифмов экскреции всех исследуемых мочевых маркеров – L-FABP/Кр., NGAL/Кр. и коллагена IV типа/Кр., соответственно.

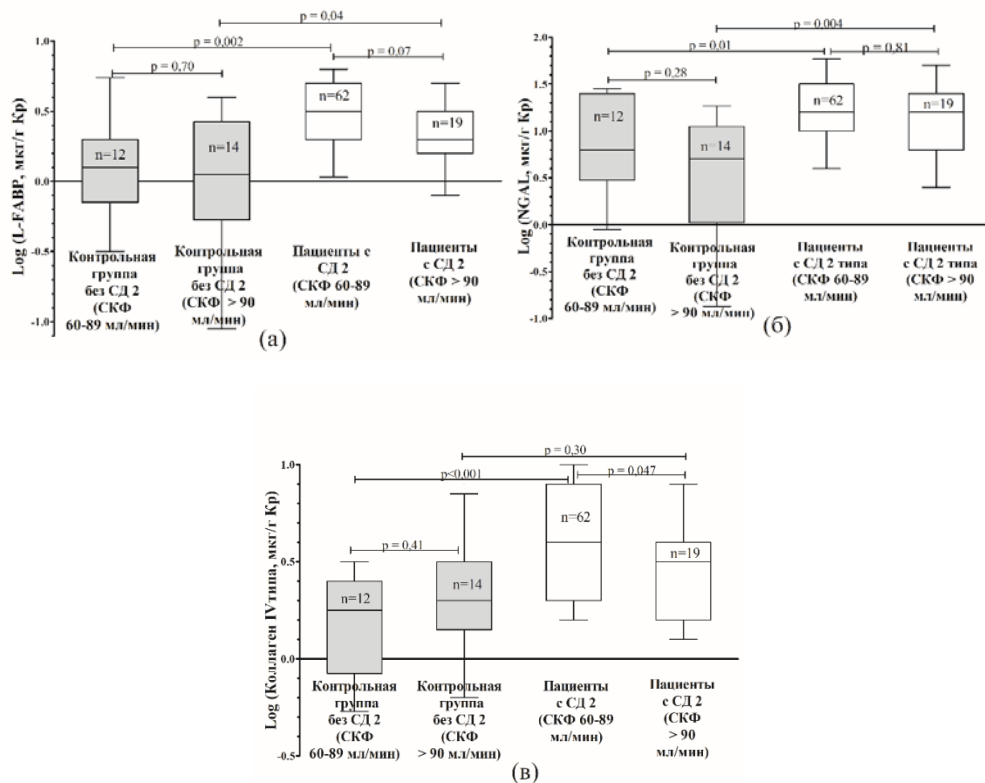


Рисунок 12 – Сравнение логарифмов величины экскреции L-FABP/Кр. (а), NGAL/Кр. (б) и коллагена IV/Кр. (в) в контрольной группе и у больных СД 2 типа при нормальной СКФ и при незначительном её снижении

Примечание – сравнение между группами контроля и пациентами с СД 2 типа в пределах одинакового диапазона рСКФкр или внутри группы в зависимости от диапазона рСКФкр. Результаты представлены в виде указания 25-го и 75-го перцентилей с медианой (центральная линия), планки погрешностей показывают 10-й и 90-й перцентили. Log – десятичный логарифм.

При этом статистически значимым оказалось повышение экскреции NGAL/Кр. и L-FABP/Кр. Кроме того, величина экскреции NGAL/Кр. и L-FABP/Кр. при рСКФкр 60-89 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> также значимо превышала аналогичные показатели в контрольной группе (Рисунок 12(а) и 12(б), соответственно). Уровни экскреции всех трёх маркеров в контрольной группе, а также L-FABP/Кр. и NGAL/Кр. у пациентов с СД 2 типа статистически значимо не различались в зависимости от градации рСКФкр.

#### **4.1.5 Взаимосвязь уровня биомаркеров повреждения почек с классическими маркерами почечного поражения**

Для поиска ассоциаций исследуемых мочевых маркеров с классическими маркерами почечного поражения выполнялся корреляционный анализ. Согласно представленным в Таблице 8 данным, величины экскреции L-FABP/Кр. и коллагена IV/Кр. положительно слабо или со средней силой зависели от уровня креатинина и цистатина С сыворотки, а также АКС, и значимо повышались по мере снижения рСКФкр и рСКФцис. Значимая отрицательная слабая корреляция с рСКФкр-цис выявлена только для коллагена IV/Кр. Уровень NGAL/Кр. значимо не зависел от креатинина сыворотки и рассчитанной на его основании СКФ, но при этом со средней силой положительно коррелировал с уровнем цистатина С и АКС, а отрицательно – с рСКФцис. Наиболее сильные прямые взаимосвязи выявлены между АКС и мочевыми маркерами L-FABP/Кр. и коллагеном IV/Кр.

Таблица 8 – Характер корреляционных связей между уровнем исследуемых маркеров почечного повреждения и показателями почечной функции в группе больных СД 2 типа (n=81)

Значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R) для исследуемой переменной р (Значимость)	Соотношение L-FABP к креатинину в моче, мкг/г Кр.	Соотношение NGAL к креатинину в моче, мкг/г Кр.	Соотношение коллагена IV к креатинину в моче, мкг/г Кр.
Креатинин сыворотки, мкмоль/л р	0,38	0,19	0,22
	< 0,001	0,08	0,04
рСКФкр (СКД EPI), мл/мин/1,73 м <sup>2</sup> р	-0,33	-0,19	-0,27
	0,002	0,08	0,01
Цистатин С сыворотки, мг/л р	0,32	0,32	0,41
	0,004	0,004	< 0,001
рСКФцис, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup> р	-0,30	-0,35	-0,45
	0,007	0,001	< 0,001
рСКФкр-цис, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup> р	-0,18	-0,13	-0,30
	0,11	0,25	0,006
Альбумин-креатининовое соотношение (АКС), мг/г Кр. р	0,56	0,37	0,62
	< 0,001	0,001	< 0,001

Для исключения влияния пола, возраста, а также приёма иАПФ/БРА, потенциально способных значимо влиять на экскрецию с мочой этих маркеров повреждения, выполнялся линейный и множественный регрессионный анализ. При этом в модели 1 уровень исследуемого маркера являлся зависимой переменной, а независимой – АКС (Таблица 9). После этого последовательно осуществляли корректировку по полу (модель 2), по возрасту (модель 3), приёму иАПФ/БРА (модель 4). Кроме того, зависимость исследуемого маркера от рутинного показателя почечной дисфункции оценивалась с учётом градации по

уровню рСКФкр (модель 5). Согласно представленным в Таблице 9 данным, величина экскреции всех троих биомаркеров сохранила значимую зависимость от уровня АКС после корректировки по полу, возрасту, градации рСКФкр и с учётом терапии иАПФ/БРА.

Таблица 9 – Результаты регрессионного анализа взаимосвязи величины исследуемых мочевых маркеров с уровнем АКС у больных СД 2 типа (n=81)

Мо де ль	Зависимая переменная								
	Соотношение L-FABP к креатинину в моче, мкг/г Кр.			Соотношение NGAL к креатинину в моче, мкг/г Кр.			Соотношение коллагена IV к креатинину в моче, мкг/г Кр.		
	бета	R <sup>2</sup>	p	бета	R <sup>2</sup>	p	бета	R <sup>2</sup>	p
1	0,56	0,31	<0,001	0,45	0,19	<0,001	0,58	0,34	<0,001
2	0,55	0,32	<0,001	0,44	0,20	<0,001	0,58	0,34	<0,001
3	0,55	0,31	<0,001	0,42	0,21	<0,001	0,54	0,38	<0,001
4	0,56	0,31	<0,001	0,43	0,23	<0,001	0,57	0,35	<0,001
5	0,54	0,32	<0,001	0,42	0,21	<0,001	0,58	0,34	<0,001

Примечание – бета – стандартизованный коэффициент. R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации. p – уровень значимости. Модель 1: зависимая переменная – исследуемый маркер, независимая переменная – АКС; Модель 2: корректировка с учётом пола; Модель 3: корректировка с учётом возраста; Модель 4: корректировка с учётом приема ингибиторов АПФ/БРА; 5 – корректировка с учётом градации уровня рСКФкр.

Кроме того, уровень мочевых биомаркеров положительно коррелировал друг с другом (Рисунок 13). Так, повышение выделения с мочой коллагена IV/Кр. было ассоциировано с нарастанием экскреции маркеров канальцевого повреждения: выражено – L-FABP/Кр. ( $\beta=0,46$ ,  $p<0,0001$ ) и в меньшей степени – NGAL/Кр. ( $\beta=0,21$ ,  $p=0,046$ ).

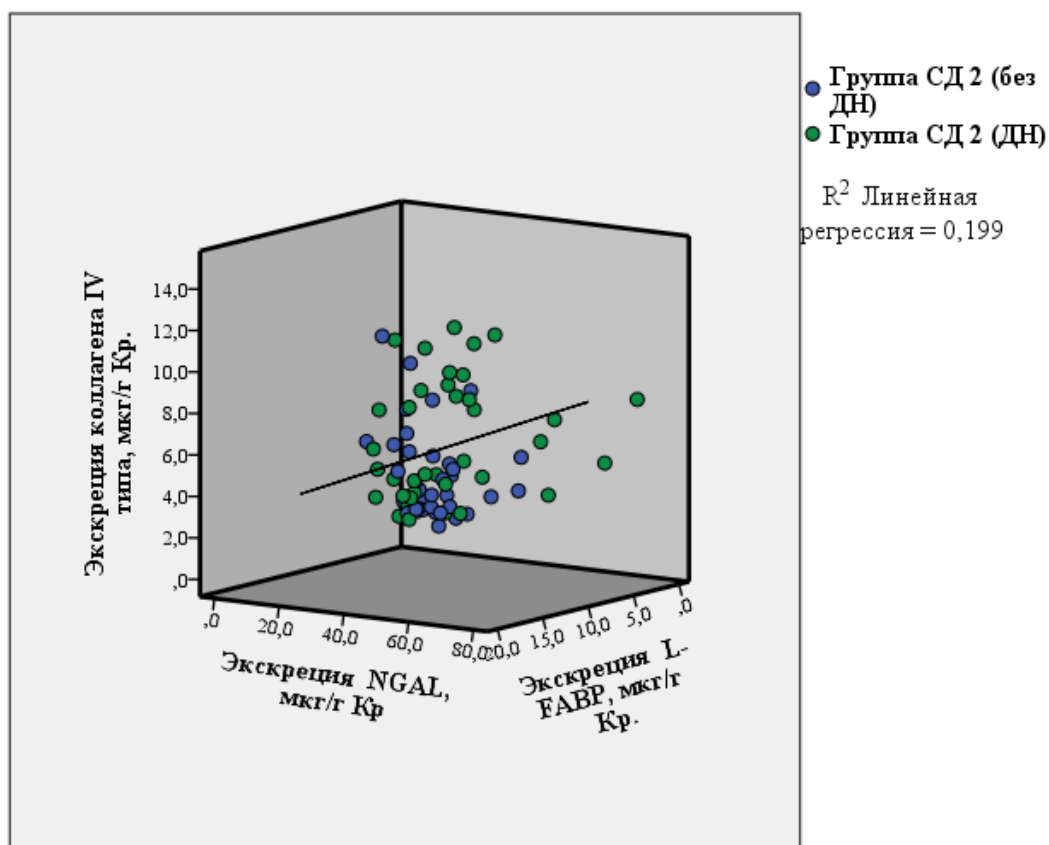


Рисунок 13 – Трёхмерная диаграмма рассеивания, отображающая зависимость экскреции коллагена IV/Кр. от L-FABP/Кр. и NGAL/Кр. у больных СД 2 типа в зависимости от наличия или отсутствия диабетической нефропатии

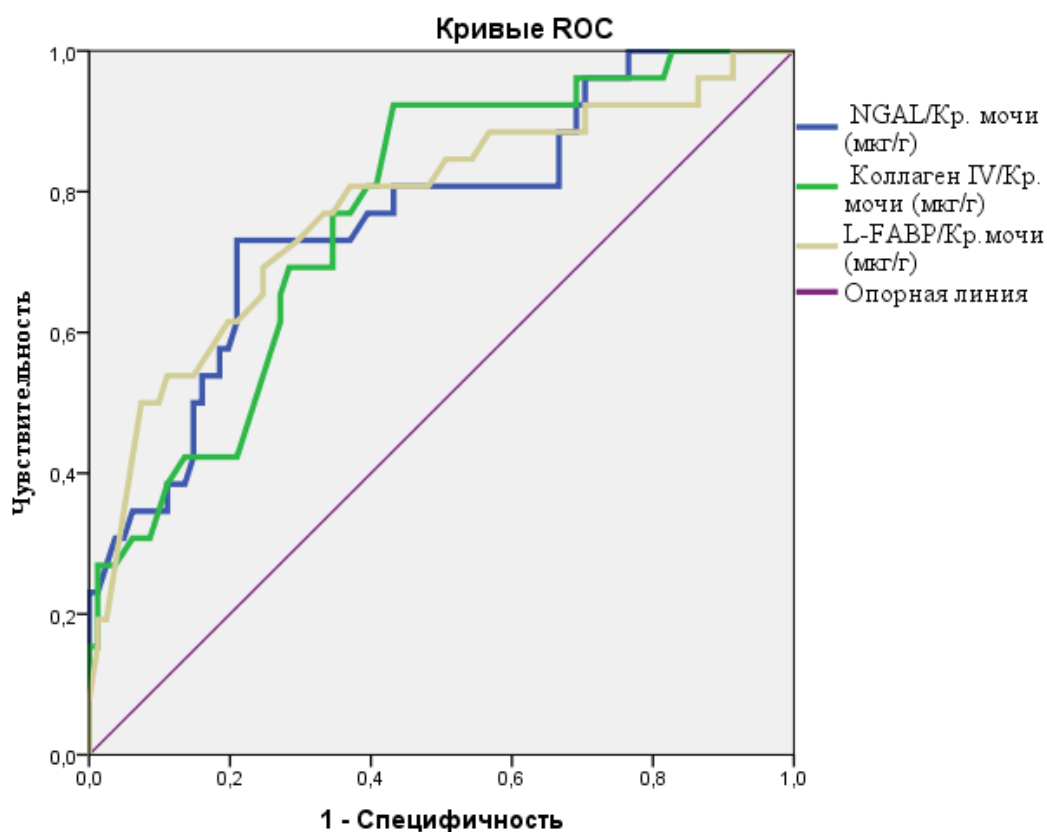
С целью поиска независимого от альбуминурии маркера, указывающего на снижение СКФ, в линейную регрессионную модель включались показатели рСКФкр и рСКФцис в качестве зависимой переменной, а мочевые биомаркеры – в качестве независимых предикторов, после чего осуществляли корректировку по уровню АКС (Таблица 10). Высокие уровни всех трёх исследуемых мочевых биомаркеров являлись предикторами сниженного уровня рСКФцис. Повышение L-FABP/Кр. и NGAL/Кр. также свидетельствовало о сниженном уровне рСКФкр. После корректировки по уровню АКС значимость сохранилась только для слабой отрицательной зависимости рСКФцис от экскреции NGAL/Кр. (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты регрессионного анализа взаимосвязи изменения рСКФ от уровня экскреции с мочой исследуемых биомаркеров в группе больных СД 2 типа (n=81)

Зависимая переменная	Независимые переменные (предикторы)								
	Соотношение L-FABP к креатинину в моче, мкг/г Кр.			Соотношение NGAL к креатинину в моче, мкг/г Кр.			Соотношение коллагена IV к креатинину в моче, мкг/г Кр.		
	бета	R <sup>2</sup>	P	бета	R <sup>2</sup>	p	бета	R <sup>2</sup>	p
рСКФкр	-0,22	0,05	0,049	-0,22	0,05	0,049	-0,18	0,03	0,10
рСКФкр /АКС	-0,10	0,08	0,44	-0,13	0,08	0,31	-0,04	0,07	0,76
рСКФцис	-0,27	0,08	0,01	-0,38	0,14	0,001	-0,34	0,11	0,002
рСКФцис /АКС	-0,14	0,12	0,29	-0,29	0,17	0,01	-0,23	0,14	0,08

Примечание – бета – стандартизованный коэффициент. R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации. p – уровень значимости. /АКС – корректировка по уровню АКС.

Для поиска оптимального порога отсечения для величины экскреции мочевых маркеров применялся анализ классификаций с применением ROC-кривых, в котором переменной состояния была выбрана контрольная группа участников без СД 2 типа (Рисунок 14). Рассчитанные площади под кривой для экскреции всех трёх маркеров превышали 0,75. Согласно полученным данным, 73,1% больных с СД 2 типа имели уровень экскреции NGAL/Кр. выше 8,45 мкг/г. При этом в таком же диапазоне экскреция NGAL/Кр. находилась у 21,0% участников без СД 2 типа (Рисунок 14).



Тестовая переменная	Площадь под кривой Доверительный интервал (ДИ)	Оптимальный порог отсечения	Чувствительность	Специфичность	Асимптотическая значимость
L-FABP/Кр. мочи (мкг/г)	0,78 ДИ 0,66; 0,89	1,95	73,1%	70,4%	<0,001
NGAL/Кр. мочи (мкг/г)	0,76 ДИ 0,66; 0,87	8,45	73,1%	79,0%	<0,001
Коллаген IV/Кр. мочи (мкг/г)	0,77 ДИ 0,67; 0,87	2,65	73,1%	65,4%	<0,001

Рисунок 14 – Результаты анализа с применением ROC-кривых для поиска оптимального порога отсечения для величин экскреции маркеров NGAL/Кр., L-FABP/Кр. и коллагена IV типа/Кр.



## 4.2 Метаболические и почечные эффекты добавления метформина или вилдаглиптина на 6 месяцев больным сахарным диабетом 2 типа, получающим терапию инсулином

### 4.2.1 Характеристика обследованных больных сахарным диабетом 2 типа, включенных в проспективное исследование

Из 70 включенных в проспективное 6-месячное клиническое исследование пациентов с СД 2 типа из числа тех, кто участвовал в поперечном исследовании по оценке уровня биомаркеров, завершили его 66 участников. Из них 21 человек – в группе продолжения инсулинотерапии (контрольная группа И), 23 пациента – в группе добавления к инсулинотерапии вилдаглиптина в дозе 50 мг в сутки (группа И+В) и 22 человека – в группе добавления метформина в дозе 1500 мг в сутки (группа И+М). Сравнимые группы были сопоставимы по поло-возрастным, антропометрическим и основным клиническим характеристикам, что отражено в Таблице 11. Несмотря на то, что сердечно-сосудистые заболевания в анамнезе несколько чаще имели пациенты контрольной группы И, наибольший процент принимающих гиполипидемическую и антигипертензивную терапию, включая иАПФ или БРА, наблюдался у больных СД 2 типа группы И+В (Таблица 11).

Таблица 11 – Характеристика больных СД 2 типа в группах продолжения инсулинотерапии или добавления к ней вилдаглиптина или метформина

Показатель	Контрольная группа И n=21	Группа И+В n=23	Группа И+М n=22	p
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 типа, 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 постпрандиальная, 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
Суточная 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 <sup>2</sup>	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
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
Диабетическая нефропатия, ХБП категория А 2, n (%)	12 (57,1%)	14 (60,9%)	11 (50,0%)	0,74
Гиполипидемическая терапия, n (%)	11 (52,4%)	15 (65,2%)	9 (41,0%)	0,64
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
Анамнез сердечно-сосудистых заболеваний, 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
Примечание – * – p<0,05 versus группа И+В. Значения p≥0,05 при попарном сравнении не показаны.				

Спектр сердечно-сосудистой патологии у пациентов сравниваемых групп приведён на Рисунке 15. Статистических различий в сравниваемых группах выявлено не было (значения p не показаны).

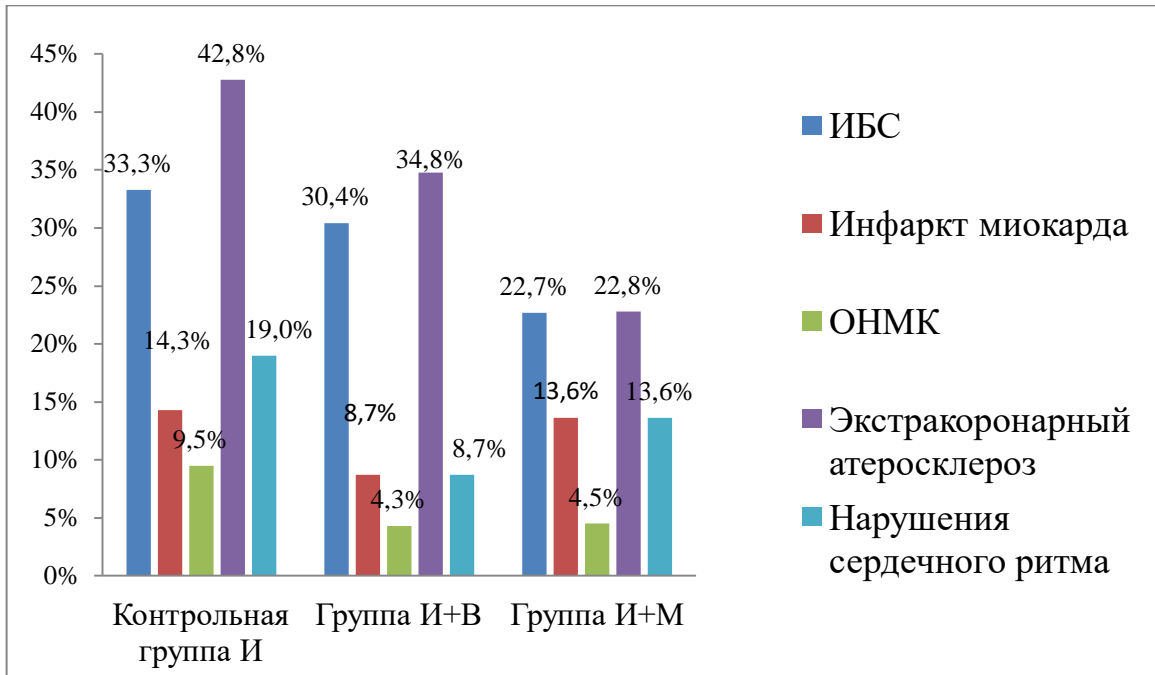


Рисунок 15 – Частота развития сердечно-сосудистых заболеваний в группах продолжения инсулинотерапии или добавления к ней вилдаглиптина или метформина

#### 4.2.2 Показатели почечной функции и маркеры повреждения почек у больных сахарным диабетом 2 типа, включенных в проспективное исследование

Исходные почечные показатели в сравниваемых группах приведены в Таблице 12. Основные оцененные маркеры значимо не различались в сравниваемых группах, за исключением уровня цистатина С сыворотки. В контрольной группе I выявлялся значимо более высокий уровень цистатина С сыворотки при сравнении с группой И+В ( $p=0,03$ ), что отразилось на более низких показателях рСКФцис, однако, разница между сравниваемыми группами являлась незначимой. Показатели рСКФкр, как и при анализе результатов исследования по маркерам, были ниже значений рСКФцис.

Таблица 12 – Показатели почечной функции и маркеры повреждения почек в сравниваемых группах больных сахарным диабетом 2 типа, включенных в проспективное исследование

Показатель	Контрольная группа И n=21	Группа И+В n=23	Группа И+М n=22	р для всех групп
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	81,9±10,0	82,7±13,6	82,4±13,4	0,92
рСКФкр (СКД EPI), мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	76,4±13,05	76,0±15,5	75,4±13,3	0,93
Цистатин С сыворотки, мг/л	0,94±0,15	0,84±0,11*	0,85±0,12	0,02
рСКФцис, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	87,3±16,7	92,9±13,9	90,1±14,5	0,39
рСКФкр-цис, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	81,5±13,1	84,7±14,1	85,0±11,3	0,61
АКС, мг/г Кр. Среднее ± СО Медиана [25 %; 75 %]	61,7±66,7 26,7 [20,1; 70,4]	55,5±74,8 28,6 [15,0; 61,4]	55,9±72,9 26,7 [13,2; 54,1]	0,95
Коллаген IV типа, мкг/г Кр. Среднее ± СО Медиана [25 %; 75 %]	4,7 ± 2,7 3,8 [2,4; 7,2]	4,6 ± 3,9 3,3 [1,7; 6,9]	3,8 ± 2,9 2,6 [1,5; 6,5]	0,59
L-FABP, мкг/г Кр. Среднее ± СО Медиана [25 %; 75 %]	2,8 ± 1,5 2,4 [1,8; 4,0]	3,1 ± 2,6 2,6 [1,4; 4,3]	3,4 ± 2,2 2,8 [1,6; 4,3]	0,74
NGAL, мкг/г Кр. Среднее ± СО Медиана [25 %; 75 %]	21,1±25,9 14,0 [5,3; 24,2]	26,6±24,4 19,6 [8,6; 38,8]	19,3±14,9 13,8 [9,5; 24,7]	0,52
Примечание – СО – стандартное отклонение. * – p<0,05 versus контрольная группа И. Значения p≥0,05 при попарном сравнении не показаны.				

### 4.2.3 Изменение показателей гликемического контроля, метаболического статуса и АД за 6 месяцев в группах продолжения терапии инсулином или добавления к ней метформина или вилдаглиптина

В таблице 13 приведены квартили абсолютных значений динамики оцененных показателей гликемического контроля, метаболического статуса и АД за 6 месяцев исследования. Как видно из Таблицы 13, в контрольной группе не произошло значимого изменения оцененных показателей. После добавления вилдаглиптина за 6 месяцев значительно улучшились все показатели гликемического контроля. У пациентов группы И+М за 6 месяцев после добавления метформина также произошло значимое улучшение показателей контроля гликемии. Сравнение абсолютных значений динамики в трёх группах больных СД 2 типа продемонстрировало, что при сопоставимом сахароснижающем эффекте добавление вилдаглиптина, в сравнении с метформином, значительно уменьшало частоту гипогликемий ( $p=0,03$ ). При этом добавление к инсулинотерапии метформина продемонстрировало преимущество в контроле избыточного ИМТ по сравнению с комбинацией инсулина с вилдаглиптином ( $p=0,01$ ) (Таблице 13).

Таблица 13 – Абсолютные значения динамики показателей гликемического контроля, метаболического статуса и АД за 6 месяцев в группах продолжения инсулинотерапии или добавления к ней вилдаглиптина или метформина

Оцениваемые показатели в группах сравнения	Группа терапии инсулином (группа И) n=21	Группа терапии инсулином и вилдаглиптином (группа И+В) n=23	Группа терапии инсулином и метформином (группа И+М) n=22	р для всех групп
	Абсолютные значения динамики, медиана [25%;75%]			
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	0,32	0,18	-0,6	<0,001

	[-2,3; -0,7]	[-0,3; 0,36]	[-1,1; -0,13]**#	
Уровень холестерина сыворотки, ммоль/л	-0,14 [-0,3; 0,16]	-0,13 [-0,33; 0,24]	-0,3 [-0,51; 0,23]	0,41
Уровень триглицеридов сыворотки, ммоль/л	-0,04 [-0,14; 0,25 ]	-0,18 [-0,34; 0,13]	-0,14 [-0,49; 0,03]*	0,03
Систолическое АД, мм рт. ст.	2,0 [-2,5; 4,5]	-1,0 [-3,0; 2,0]	-1,5 [-3,0; 2,0]	0,45
Диастолическое АД, мм рт. ст.	2,0 [-3,5; 5,0] ##	-4,0 [-6,0; -3,0]**	-1,5 [-3,3; 2,0]	0,003
НbA1c , %	0,1 [-0,2; 0,15 ]	-0,2 [-0,3; -0,1]	-0,2 [-0,5; -0,1] #	0,03
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	-0,2 [-0,6; -0,7]	-0,4 [-0,8; -0,1]	-0,4 [-0,8; -0,2]	0,25
Глюкоза крови после еды, ммоль/л	-0,1 [-0,9; 1,1]	-0,4 [-1,5; 1,0]	-0,8 [-1,9; 0,4]	0,47
Суточная доза инсулина, единицы/кг/сутки	-0,004 [-0,04; 0,024 ]	-0,03 [-0,05; -0,01]	-0,03 [-0,05; -0,01]	0,07
Частота гипогликемий, случаев/месяц	0 [-1,8; 0,1]	-0,50 [-0,67; -0,17]	0,25 [-0,21; 0,54] #	0,04
Примечание – Результаты попарных сравнений:* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 versus контрольная группа И; # – p<0,05, ## – p<0,01, ### – p<0,001 versus группа И+В .				

Процентное снижение уровня НbA1c в группе добавления вилдаглиптина составило 2,8% [-4,5; -1,4] (p=0,002 при сравнении повторных измерений), глюкозы крови натощак – 5,2% [-11,4; -1,4] ( p=0,06), постпрандиальной гликемии – 5,3% [-15,8; 1,3] (p=0,036). Это привело к снижению потребности в инсулине на 6,5% [-10,0; -2,6] и сопровождалось снижением частоты гипогликемических эпизодов на 50,0% [-75,5; -12,5], p<0,01 для каждого при сравнении показателей по окончании исследования с исходными. Кроме того, в группе И+В обращало на себя внимание умеренное улучшение показателей липидограммы и контроля артериальной гипертензии. Так, в группе И+В по сравнению с исходными значениями отмечалось снижение уровня общего холестерина на 2,7% [-6,3; 4,8] (p=0,46), триглицеридов – на 10,6% [-22,8; 10,5] (p=0,17), диастолического АД – на 5,5% [-4,5; -3,5] (p<0,001 при сравнении

повторных измерений). Кроме того, отмечалось мягкое снижение систолического АД на 0,8% [-2,3; 1,6],  $p=0,32$ .

По сравнению с исходными значениями на фоне добавления метформина отмечалось снижение HbA1c на 3,0% [-6,8; -1,3], глюкозы крови натощак – на 5,6% [-12,6; -2,4], постпрандиальной гликемии – на 9,1% [-21,1; 5,1],  $p=0,005$ , 0,02 и 0,04, соответственно. Это сопровождалось снижением суточной дозы вводимого инсулина на 6,9% [-10,0; 3,2],  $p=0,001$ . Кроме того, в группе И+М зарегистрировано значимое снижение ИМТ на 1,9% [-3,1; -0,4] ( $p=0,005$ ) и уровня триглицеридов сыворотки на 7,3% [-30,4; 1,8] ( $p=0,02$ ) по сравнению с исходным уровнем. Тем не менее, снижение показателей глюкозы крови при добавлении метформина, в отличие от вилдаглиптина, сопровождалось незначимым повышением на 25% [-22,2; 100,0] ( $p=0,41$ ) общего числа лёгких гипогликемий, которые пациенты купировали самостоятельно приёмом «быстрых» углеводов. Случаев развития тяжёлых гипогликемий, потребовавших вызова бригады скорой помощи, ни в одной группе за время наблюдения не отмечено. На фоне добавления метформина, наряду с улучшением показателей метаболического статуса, отмечалось незначимое умеренное снижение как систолического, так и диастолического АД (Таблица 13).

Когда мы сравнили процентное изменение оцененных показателей во всех трёх группах (Рисунок 16), для группы И+В, в сравнении с пациентами контрольной группы, статистическая значимость сохранилась только для снижения диастолического АД ( $p=0,001$ ), гликированного гемоглобина ( $p=0,01$ ) и уменьшения частоты гипогликемических эпизодов ( $p=0,03$ ). Сравнение динамики показателей в группе И+М с контролем подтвердило статистическую значимость улучшения HbA1c ( $p=0,04$ ) и снижения ИМТ ( $p<0,001$ ).

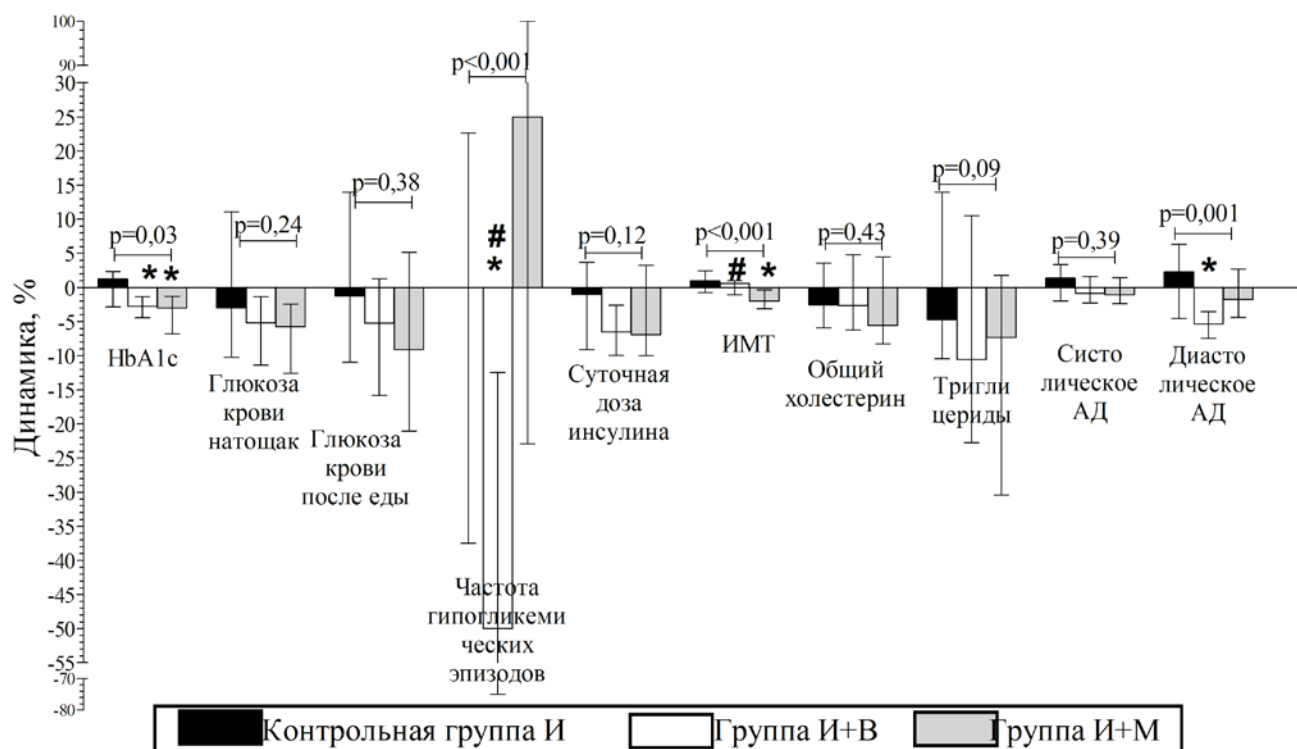


Рисунок 16 – Сравнение процентного изменения показателей гликемического контроля, метаболического статуса и АД за 6 месяцев наблюдения в исследуемых группах больных СД 2

Примечание – Высота столбиков показывает медиану значения относительной динамики показателя, вертикальные линии – межквартильный размах. p – результаты одновременного сравнения динамики показателя за 6 месяцев во всех трёх группах. Результаты попарного сравнения: \* –  $p < 0,05$  versus Контрольная группа (И); # –  $p < 0,05$  versus Группа терапии инсулином и метформином (И+М). Значения  $p \geq 0,05$  при попарном сравнении не показаны.

#### 4.2.4 Динамика показателей почечной функции и маркеров повреждения почек за 6 месяцев в группах продолжения терапии инсулином или добавления к ней метформина или вилдаглиптина

За 6 месяцев наблюдения во всех трёх исследуемых группах больных СД 2 типа не произошло значимого изменения креатинина сыворотки, рСКФкр и АКС (Рисунок 17(а), (б) и (в), соответственно).



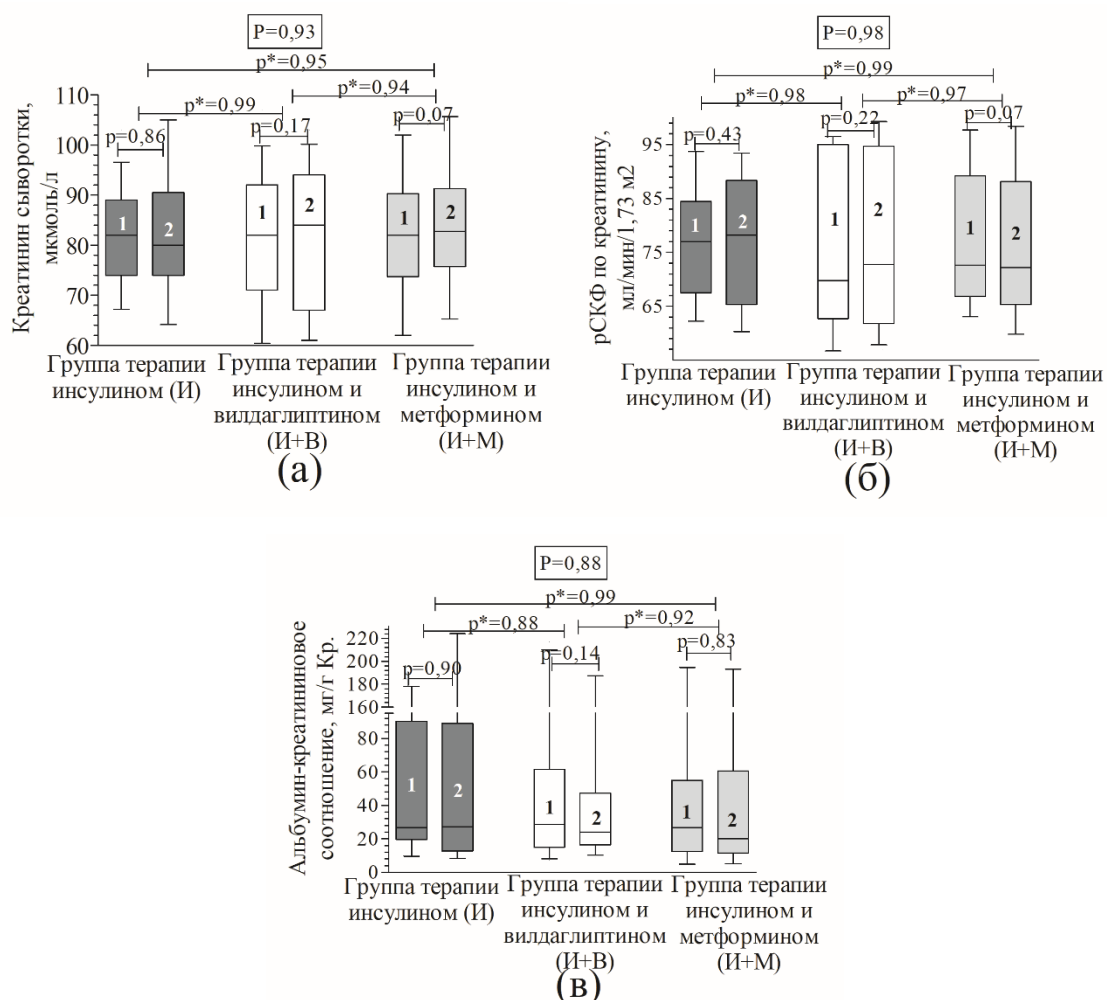


Рисунок 17 – Сравнение изменения креатинина сыворотки (а), рСКФкр (б) и альбумин-креатининового соотношения (в) за 6 месяцев исследования в группах продолжения инсулинотерапии или добавления к ней вилдаглиптина или метформина

Примечание – Здесь и далее на Рисунках 18-19 результаты представлены в виде прямоугольников, указывающих 25-й и 75-й перцентили с медианой (центральная линия). Вертикальные линии, выходящие из прямоугольников, обозначают 10 и 90 перцентили. р – сравнение изменения показателей, оцененных на первом визите (1) и через 6 месяцев на втором визите (2) в каждой группе.  $\boxed{P}$  – результаты сравнения изменения показателя за 6 месяцев наблюдения одновременно в трёх группах И, И+В и И+М, р\*- результаты попарного сравнения изменения показателя в группах.

В группе И+В близким к значимому оказалось снижение АКС (на 12,2% [-25,9%; 36,6],  $p=0,14$ ), которое было зарегистрировано у 65,2% пациентов. Примечательно, что более чем у половины пациентов контрольной группы (52,4%) регистрировалось снижение альбуминурии разной степени выраженности, в связи с чем общее снижение АКС в группе И по окончании исследования составило 5,5% [-32,0; 29,1], что оказалось, однако, статистически незначимым ( $p=0,9$ ) в сравнении с исходным уровнем. На фоне добавления к инсулинотерапии метформина было выявлено близкое к значимому повышение уровня креатинина сыворотки (+1,9% [-1,6; 4,7],  $p=0,07$  в сравнении с исходным значением) и снижение рСКФ, оцененной по креатинину, на 2,0% [-4,8; 1,6],  $p=0,073$ .

В контрольной группе за 6 месяцев наблюдения не произошло значимого изменения уровней цистатина С сыворотки, рСКФцис и рСКФкр-цис (Рисунок 18(а), (б) и (в), соответственно). Добавление вилдаглиптина больным СД 2 типа на инсулинотерапии за 6 месяцев привело к значимому снижению цистатина С сыворотки (на 8,7% [-12,7; -3,6],  $p<0,001$ , (Рисунок 18 (а)), что отразилось на существенном повышении рСКФцис (на 7,0% [3,7; 13,3]),  $p<0,001$ , Рисунок 18(б)) и рСКФкр-цис (на 5,1% [1,4; 8,5],  $p=0,001$ , Рисунок 18 (в)). В группе И+М существенно не изменилась СКФ, рассчитанная на основании цистатина С сыворотки (Рисунок 18(б)), уровень которого в группе И+М значимо не повысился (+1,3% [-1,1; 2,8],  $p=0,09$ ) (Рисунок 18(а)). Общее снижение рСКФцис в группе И+М было равным 0,7 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> [-2,3; 1,3], что составило 0,6% [-2,6; 1,3] от исходных значений,  $p=0,11$ . Тем не менее, расчёт СКФ на основании обоих сывороточных маркеров (рСКФкр-цис) показал статистически значимое уменьшение фильтрационной способности почек (Рисунок 18(в)) на фоне 6-месячного добавления метформина.

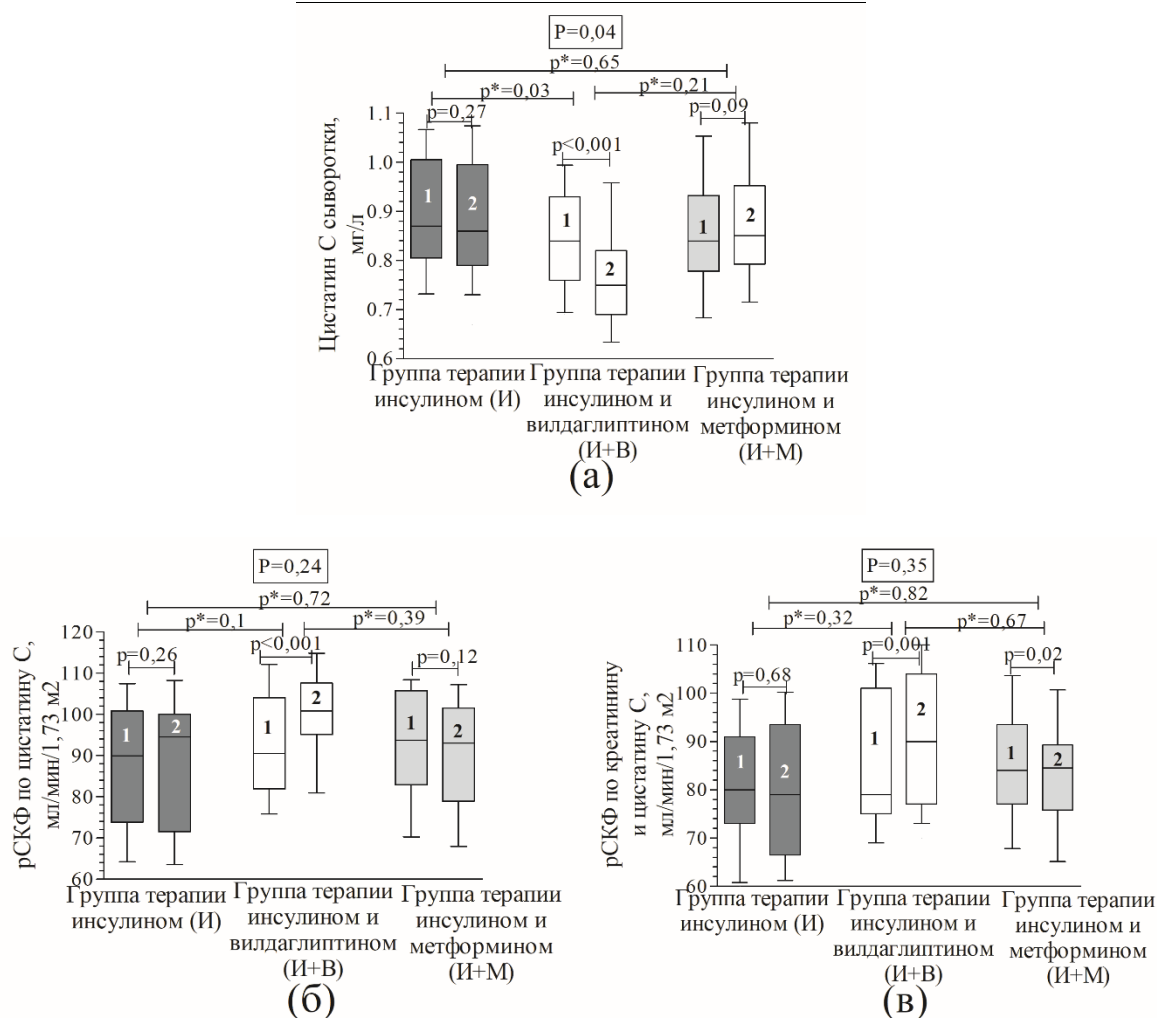


Рисунок 18 – Сравнение изменения сывороточного цистатина С (а), рСКФцис (б) и рСКФкр-цис (в) за 6 месяцев исследования в группах продолжения инсулинотерапии или добавления к ней вилдаглиптина или метформина

Повышение рСКФцис и рСКФкр-цис в группе И+В сопровождалось не только умеренным снижением альбуминурии, но и выраженным уменьшением экскреции коллагена IV/Кр., составившим 32,8 % [-55,8; -24,4],  $p < 0,001$  (Рисунок 19 (а)). Снижение экскреции коллагена IV/Кр. разной степени выраженности было зарегистрировано у 86,9 % больных СД 2 типа группы И+В. При этом динамика маркеров повреждения канальцев почек в целом в группе И+В оказалась незначимой (Рисунок 19(б-в)).

В группе И+М на фоне отсутствия значимого изменения экскреции с мочой коллагена IV типа (Рисунок 19 (а)) отмечалось выраженное уменьшение выделения с мочой канальцевых маркеров L-FABP/Кр. (на 37,7% [-64,9; 19,9]) и NGAL/Кр. (на 42,8% [-61,5; -15,7]),  $p < 0,001$  для каждого при сравнении с исходными показателями в начале исследования (Рисунок 19(б) и 19(в), соответственно). Снижение экскреции этих маркеров разной степени выраженности произошло практически у всех больных СД 2 типа (у 90,9% и 95,5%, соответственно).

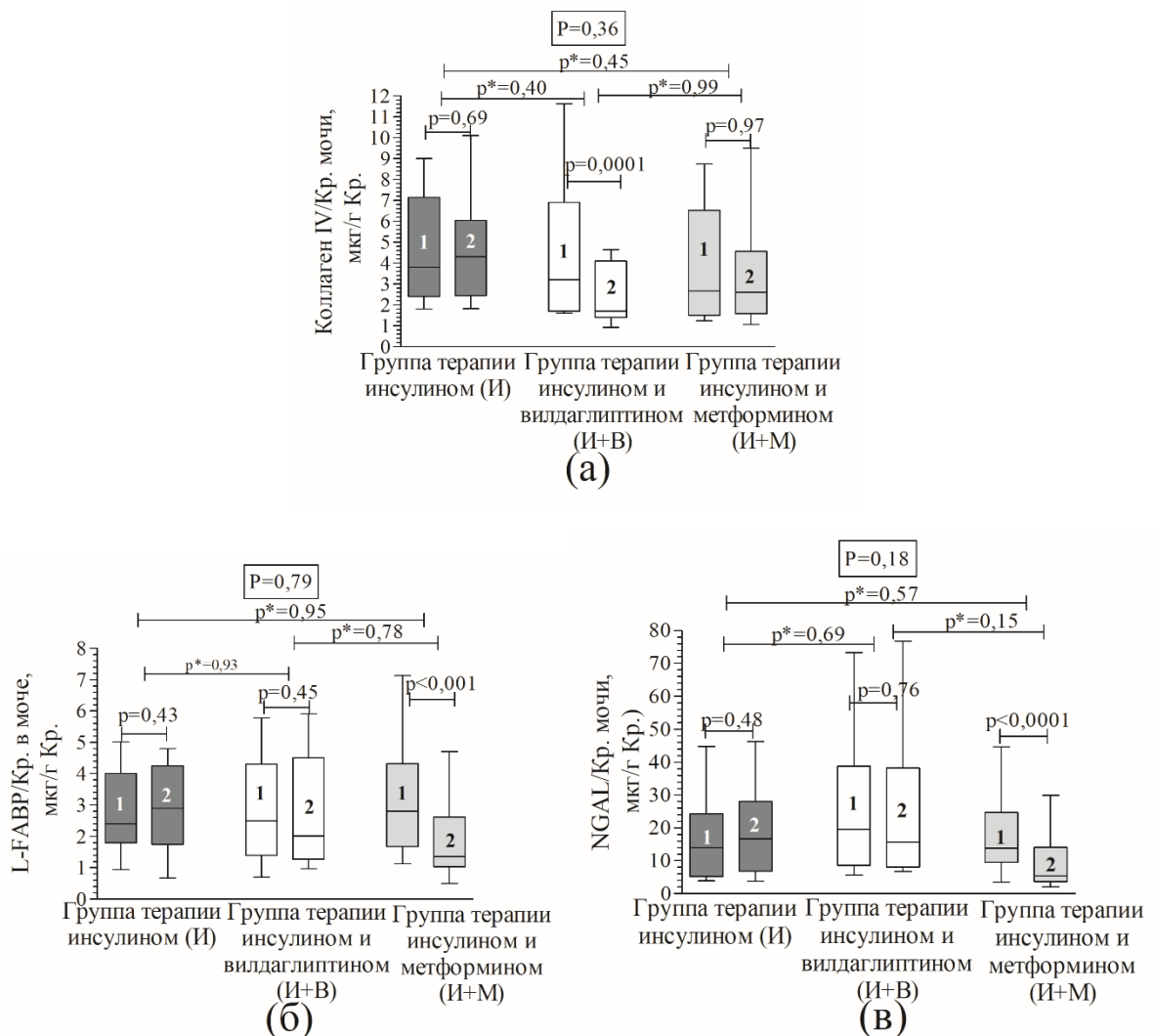


Рисунок 19 – Сравнение изменения экскреции маркеров повреждения почек коллагена IV типа (а), L-FABP/Кр. (б) и NGAL/Кр. (в) за 6 месяцев исследования в группах продолжения инсулинотерапии или добавления к ней вилдаглиптина или метформина

Для сравнения изменения почечных показателей за 6 месяцев одновременно в трёх группах был выполнен однофакторный дисперсионный анализ, сравнивающий повторные измерения маркеров (Рисунки 17-19) и их процентное изменение (Рисунок 20). Согласно результатам сравнения повторных измерений, статистически значимое различие зафиксировано для динамики цистатина С сыворотки ( $p=0,04$ ) (Рисунок 18(a)). При этом снижение уровня цистатина С в группе И+В было значимым как при сравнении с контролем, так и с группой И+М.

Результаты сравнения динамики (в процентах) оцененных маркеров одновременно в трёх группах, а также попарно, приведены на Рисунке 20. Согласно полученным данным, значимо между тремя группами различались динамика цистатина С сыворотки, рСКФцис, рСКФкр-цис, экскреции коллагена IV типа и обоих канальцевых маркеров повреждения. При этом в группе И+В снижение уровня сывороточного цистатина С, повышение рСКФцис и рСКФкр-цис с одновременным снижением экскреции коллагена IV типа оказалось значимым при сравнении как с показателями динамики у больных СД 2 типа группы контроля, так и группы И+М (Рисунок 20). Процентное снижение экскреции NGAL/Кр. и L-FABP/Кр. на фоне добавления метформина значимо превосходило изменение этих маркеров в двух других группах (И и И+В). Это сопровождалось умеренным снижением рСКФкр-цис (Рисунок 20).

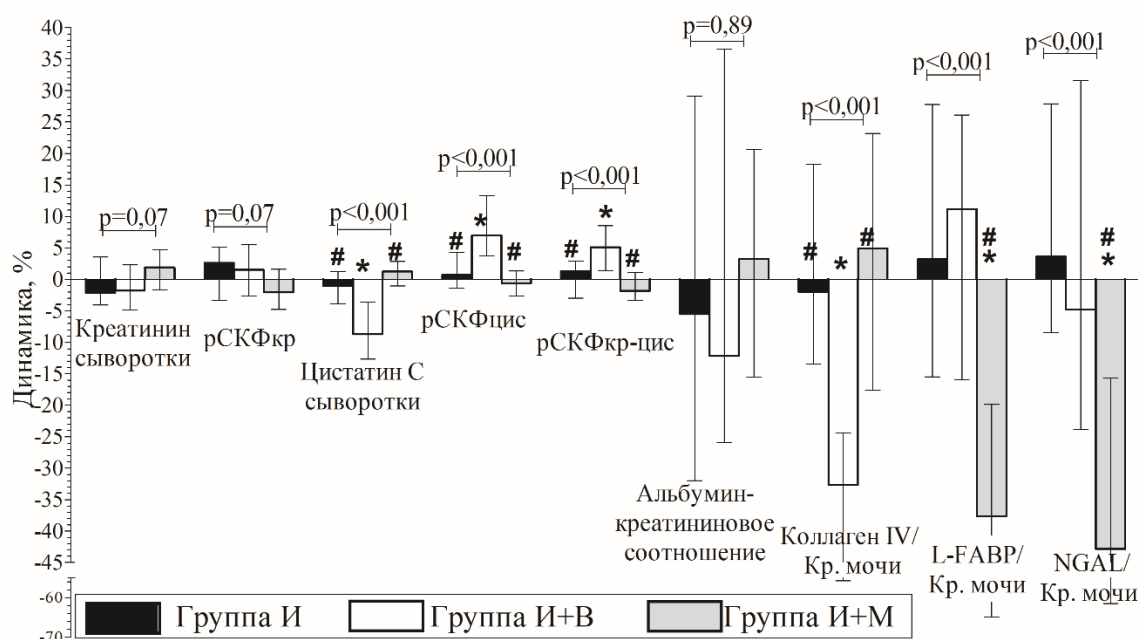


Рисунок 20 – Сравнение процентного изменения почечных показателей за 6 месяцев наблюдения в исследуемых группах продолжения инсулинотерапии или добавления к ней вилдаглиптина или метформина

Примечание – Высота столбиков показывает медиану значения относительной динамики показателя, вертикальные линии - межквартильный размах.  $p$  – результаты одновременного сравнения динамики показателя за 6 месяцев во всех трёх группах. Результаты попарного сравнения: \* –  $p < 0,05$  versus Контрольная группа (И); # –  $p < 0,05$  versus Группа терапии инсулином и вилдаглиптином (И+В). Значения  $p \geq 0,05$  при попарном сравнении не показаны.

#### 4.2.5 Оценка взаимосвязи динамики почечных показателей с изменением показателей компенсации сахарного диабета 2 типа в группах добавления к инсулинотерапии метформина или вилдаглиптина

Для поиска взаимосвязей между динамикой значимо изменившихся в группах И+В и И+М почечных маркеров и динамикой показателей гликемического контроля, метаболического статуса и АД был выполнен корреляционный анализ, результаты которого представлены в Таблице 14. Как

видно из представленных в Таблице 14 данных, полученное в группе И+В снижение экскреции коллагена IV типа и повышение рСКФцис и рСКФкр-цис, ассоциированное со значимым уменьшением цистатина С сыворотки, не зависело от сахароснижающего действия вилдаглиптина (Таблица 14). Улучшение показателей контроля гликемии также значимо не повлияло на динамику экскреции L-FABP/Кр. у пациентов группы И+М, однако снижение выделения этого маркера было ассоциировано со снижением ИМТ ( $R=0,46$ ,  $p=0,03$ ). Кроме того, выявлена умеренная обратная зависимость изменения экскреции NGAL/Кр. от динамики показателей гликемии натощак ( $R=-0,46$ ,  $p=0,03$ ). При этом динамика HbA1c и постпрандиальной гликемии не оказывала существенного влияния на изменение уровня экскреции NGAL/Кр. (Таблица 14).

Таблица 14 – Характер корреляционных связей между динамикой значимо изменившихся показателей поражения почек и изменением отдельных факторов риска диабетической нефропатии

Группы со значимым изменением почечных маркеров	Группа терапии инсулином и вилдаглиптином (группа И+В) n=23				Группа терапии инсулином и метформином (группа И+М) n=22		
	Показатели почечной функции и маркеры повреждения почек, значимо изменившиеся в сравниваемых группах за 6 месяцев						
Показатели динамики (%)	Цистатин С крови	рСКФцис	рСКФкр-цис	Коллаген IV/Кр. мочи	L-FABP/Кр. мочи	NGAL/Кр. мочи	рСКФкр-цис
HbA1c, %	-0,31	0,21	0,19	0,13	0,33	-0,1	-0,01
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	-0,22	0,2	0,14	0,13	0,24	-0,46*	-0,02
Глюкоза крови постпрандиальная, ммоль/л	-0,24	0,16	0,22	0,25	0,18	0,06	-0,21
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,11	0,08	-0,15	-0,13	0,46*	0,26	-0,12

Систолическое АД, мм рт. ст.	0,25	-0,19	-0,25	-0,02	-0,17	-0,04	-0,06
Диастолическое АД, мм рт. ст.	0,23	-0,27	-0,24	0,05	0,14	0,03	-0,16
Общий холестерин, ммоль/л	0,14	-0,25	-0,20	-0,68	0,11	0,20	0,39
Триглицериды, ммоль/л	0,36	-0,27	-0,28	-0,07	-0,40	-0,35	-0,05
Примечание – Показаны значение коэффициента корреляции Спирмена для исследуемых переменных. * – $p < 0,05$ .							

В регрессионном анализе с пошаговым включением переменных, в котором динамика (%) изменившегося почечного показателя являлась зависимой переменной, при поиске значимых ковариат в группе И+В также не было выявлено значимой взаимосвязи с улучшением компенсации СД 2 типа. Изменение систолического АД было отрицательно связано с динамикой рСКФкр-цис ( $\beta = -0,47$ ,  $R^2 = 0,22$ ,  $p = 0,02$ ).

Согласно результатам регрессионного анализа для группы И+М, снижение экскреции L-FABP/Кр. на 22 % зависело от снижения ИМТ ( $\beta = 0,47$ ,  $R^2 = 0,22$ ,  $p = 0,03$ ), а наименьшее снижение экскреции с мочой NGAL/Кр. наблюдалось при увеличении частоты гипогликемических эпизодов ( $\beta = 0,43$ ,  $R^2 = 0,19$ ,  $p = 0,045$ ).

В регрессионном анализе с пошаговым включением номинальных переменных (Таблица 15) было показано, что курение, сопутствующая сердечно-сосудистая патология и приём иАПФ/БРА (по отдельности) не оказывали значимого влияние на реализацию выявленных почечных эффектов метформина и вилдаглиптина. Вместе с тем, снижение цистатина С сыворотки в группе И+В было более выражено у пациентов, принимавших гиполипидемическую терапию ( $\beta = 0,42$ ,  $R^2 = 0,17$ ;  $V = 6,3$ , 95% ДИ (0,08-12,6),  $p = 0,047$ ).



Рисунок 15 – Результаты регрессионного анализа зависимости динамики значимо изменившихся почечных маркеров в группах И+В и И+М от табакокурения, сердечно-сосудистой патологии, приема иАПФ/БРА и гиполипидемических препаратов

Независимые номинальные переменные	Группа терапии инсулином и вилдаглиптином (группа И+В), n=23				Группа терапии инсулином и метформинном (группа И+М), n=22		
	Динамика (%) почечных маркеров, значимо изменившихся в сравниваемых группах за 6 месяцев (зависимая переменная)						
	Цистатин С крови	pСКФцис	pСКФ кр-цис	Коллаген IV/Кр. Мочи	L-FABP/ Кр. мочи	NGAL/ Кр. мочи	pСКФ кр-цис
	Стандартизованный коэффициент (бета)						
Уровень значимости (p)							
Приём иАПФ/БРА (да/нет)	0,007 0,97	0,03 0,88	0,01 0,96	-0,21 0,37	0,09 0,75	-0,42 0,15	-0,27 0,36
Анамнез сердечно-сосудистых заболеваний (да/нет)	0,23 0,3	-0,08 0,72	-0,13 0,56	-0,21 0,34	0,05 0,88	0,03 0,92	-0,08 0,80
Приём гиполипидемических препаратов (да/нет)	0,42 0,047	-0,22 0,32	-0,32 0,14	-0,18 0,42	-0,11 0,68	0,13 0,64	0,004 0,99
Курение (да/нет)	0,03 0,89	-0,06 0,78	-0,15 0,50	0,34 0,15	0,34 0,25	-0,08 0,77	0,03 0,90

### 4.3 Заключение к Главе 4

Таким образом, больные СД 2 типа в сравнении с участниками контрольной группы без СД 2 даже при уровне АКС < 30 мг/г Кр. имели повышенную экскрецию с мочой NGAL/Кр. и L-FABP/Кр. Экскреция NGAL/Кр., L-FABP/Кр. и коллагена IV/Кр. нарастала по мере прогрессии фильтрационной дисфункции и альбуминурии независимо от пола, возраста и приёма блокаторов РААС. При этом повышение экскреции маркеров канальцевого повреждения NGAL и L-FABP отмечалось даже при несниженных значениях рСКФкр и коррелировало с нарастанием экскреции коллагена IV типа. Величина экскреции NGAL/Кр. была обратно связана с рСКФцис независимо от уровня АКС.

Добавление вилдаглиптина (50 мг/сутки) к инсулинотерапии больным с СД 2 типа за 6 месяцев улучшало гликемический контроль с одновременным уменьшением частоты гипогликемических эпизодов и диастолического АД. Терапия вилдаглиптином была ассоциирована с повышением показателей фильтрационной функции почек, рассчитанных с применением цистатина С, с одновременным уменьшением экскреции маркера клубочкового повреждения коллагена IV типа/Кр. Данные почечные эффекты не зависели от улучшения гликемического контроля и были одинаковыми вне зависимости от анамнеза курения, сопутствующей сердечно-сосудистой патологии, приёма иАПФ/БРА и гиполипидемических препаратов. При сопоставимом сахароснижающем эффекте добавление метформина (1500 мг/сутки) больным СД 2 типа на инсулинотерапии способствовало снижению экскреции маркеров канальцевого повреждения L-FABP/Кр., ассоциированному со снижением избыточного ИМТ, и снижению экскреции NGAL/Кр., более выраженному при устранении сниженных значений гликемии натощак. Умеренное понижение рСКФкр-цис на фоне кратковременного добавления метформина требует оценки в долгосрочной перспективе.

## Глава 5

### ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование валидной модели ДН при СД 2 типа является одним из главных условий при изучении патогенеза развития заболевания и проведении исследований в области фармакологической нефропротекции. При моделировании ДН при экспериментальном СД 2 типа важно последовательное воспроизведение не только морфофункциональных почечных изменений, но метаболических факторов риска ДН (ожирение, дислипидемия и инсулинорезистентность), которые с высокой частотой встречаются среди пациентов с СД 2 типа [19, 24, 42, 101], что также показано в нашей работе.

Среди негенетических вариантов по своим морфофункциональным характеристикам более всего критериям AMDCC соответствует модель ДН при СД 2 типа у крыс, описанная в 2006 г. [105, 184]. В работе Sugano M. et al. СД 2 типа с умеренной гипергликемией индуцировался у взрослых самцов крыс Sprague-Dawley посредством однократной внутривенной инъекции СТЗ (40 мг/кг). В последующем для развития ожирения, инсулинорезистентности и дислипидемии крыс на протяжении 37 недель кормили коммерческим высокожировым кормом. Для ускорения наступления почечных изменений крысам выполнялась геминефрэктомия [105]. Исследователями сообщается о значимом повышении альбуминурии и умеренном снижении клиренса креатинина уже к 15 неделе эксперимента, когда морфологически в почечной ткани выявлялись начальные признаки экспансии мезангиального матрикса. Выявленные почечные нарушения усугубились к окончанию эксперимента (на 37 неделе), что сопровождалось появлением протеинурии, достоверным снижением клиренса креатинина и развитием диффузного гломерулосклероза [105]. Тем не менее, в описанной Sugano M. et al. модели не были оценены такие важные морфологические характеристики, как толщина ГБМ и тубулоинтерстициальные почечные изменения [105, 184]. Кроме того, появление гипергликемии

предшествовало формированию метаболических нарушений, что не соответствует естественному развитию СД 2 типа в клинической ситуации [24]. Вместе с тем рядом исследователей была показана возможность формирования умеренной гипергликемии и начальных клубочковых изменений на фоне высокожирового питания даже в отсутствие введения диabetогенных субстанций [30, 126]. Это подчёркивает важность первичного моделирования именно метаболических нарушений, а не СТЗ-индуцированной гипергликемии. В нашем исследовании мы модифицировали модели СД 2 типа у крыс, описанные Sugano M. et al. (2006), а также Islam S. and Choi H.(2007) [105, 114].

В описываемой нами модели предварительное выполнение правосторонней нефрэктомии с последующим назначением корма с высоким содержанием жира продолжительностью 5 недель было дополнено интервальным введением НА и СТЗ для индукции невыраженной гипергликемии. Благодаря этой модификации в предложенной нами модели СД 2 типа были инициированы основные патогенетические механизмы, запускающие процессы формирования и прогрессии ДН: инсулинорезистентность, избыточный вес и дислипидемия с последующим развитием умеренной гипергликемии и альбуминурии, что ранее в моделях СТЗ-НА-индуцированного СД у крыс не было описано. В отличие от варианта Sugano M. et al., в описанной нами модели были оценены все лабораторные, морфологические и ультраструктурные характеристики, необходимые для её валидации [105, 184]. Таким образом, к 30 неделе эксперимента крысы, помимо стойких метаболических нарушений, характеризовались повышением суточной альбуминурии более чем в 40 раз, близким к двукратному снижением клиренса креатинина (за предшествующие 20 недель), значимым утолщением ГБМ с формированием тубулоинтерстициального фиброза и начальными склеротическими процессами в клубочках. Нами не ставилась задача смоделировать выраженный гломерулосклероз и формирование протеинурии, характерных для далеко зашедших стадий ДН, считающихся относительно необратимыми [42, 159]. Не исключено, что увеличение продолжительности эксперимента позволило бы

воспроизвести и эту клиническую ситуацию. Кроме того, у крыс не оценивалось АД, поскольку данный показатель не является обязательным критерием, необходимым для валидации модели ДН у грызунов. Описанную модель отличала высокая воспроизводимость и стойкость метаболических нарушений при недлительном периоде высокожирового питания, отсутствие летальных случаев среди животных, а также стадийность почечных изменений, максимально близко воспроизводящих естественное течение относительно ранних, обратимых стадий ДН у пациентов при СД 2 типа.

Одной из важных проблем практической диабетологии на современном этапе является ранняя диагностика ДН, когда морфологические почечные изменения носят обратимый характер, а терапевтические вмешательства являются наиболее эффективными [4-6, 9, 10, 65, 93, 121, 193]. В настоящий момент уже не вызывает сомнений, что ДН при СД 2 типа клинически и морфологически гетерогенна, что не позволяет рассматривать используемые в настоящее время в рутинной практике показатели альбуминурии и рСКФкр в качестве ранних идентификаторов почечного диабетического повреждения [6, 42, 72, 117, 128, 129, 140, 145, 205]. В связи с этим активно ведётся поиск неинвазивных биомаркеров, выявляющих ранние структурные почечные изменения даже при несниженных значениях СКФ и при нормальных показателях АКС.

В нашем исследовании было выявлено, что мочевые маркеры канальцевого повреждения NGAL/Кр. и L-FABP/Кр. были повышены у больных СД 2 типа даже при АКС < 30 мг/г Кр. и в оптимальном диапазоне рСКФкр по сравнению с участниками без СД 2 типа и, наряду с экскрецией коллагена IV/Кр., повышались по мере увеличения категории альбуминурии и снижения рСКФ. Полученные нами результаты согласуются с имеющимся литературным данным [93, 94, 97, 190, 197, 201]. Так, в перекрёстном исследовании Nauta F.L. et al. (2011), выполненном на 94 больных СД, было продемонстрировано 1,5-кратное повышение экскреции NGAL даже при нормальном уровне АКС по сравнению с 45 здоровыми участниками [97]. При этом величины экскреции NGAL/Кр. были сопоставимы с полученными нами данными: 13,0 [8,0; 2,0] мкг/г Кр. у здоровых

участников и 21,0 [11,0; 72,0] мкг/г Кр. у больных СД с АКС<30 мг/г Кр. в исследовании Nauta F.L. et al. versus 5,9 [2,0; 13,4] и 13,3 [8,5; 20,5] мкг/г Кр., соответственно [97]. В другом исследовании de Carvalho J.A. et al. (2016) значимое повышение экскреции NGAL наблюдалось даже при нормальном уровне АКС<10 мг/г Кр., которое положительно коррелировало с нарастанием альбуминурии [197]. В работе Fu W.J. et al. (2012), включавшей 101 пациента с СД 2 типа, также были продемонстрированы повышенные уровни экскреции NGAL на стадии нормоальбуминурии по сравнению с 28 добровольцами без СД 2 типа [94]. Однако медианы величин экскреции NGAL у участников обеих групп в несколько раз превышали значения, полученные в нашей работе (69,2 [29,3; 120,4] мкг/г Кр. у больных группы нормоальбуминурия и 32,9 [26,1; 64,5] мкг/г Кр. у здоровых добровольцев). При этом в исследование Fu W.J. et al. включались больные в том числе с некомпенсированным СД 2 типа (средний HbA1c  $7,4 \pm 2,0\%$  с показателями гликемии натощак  $9,5 \pm 4,3$  ммоль/л). Кроме того, исследование было выполнено на китайской популяции [94]. В работе также отмечено нарастание экскреции NGAL/Кр. по мере прогрессии ХБП.

Как и в исследовании Kamiyo-Ikemori A. et al. (2011), включавшем 140 больных СД 2 типа и 412 здоровых добровольцев, уже на доальбуминурической стадии нами была выявлена значимо более высокая экскреция L-FABP, увеличивающаяся по мере прогрессии ДН [64]. Таким образом, полученные в нашем клиническом исследовании результаты позволяют утверждать, что мочевые показатели L-FABP и NGAL являются маркерами доклинической диагностики ДН. В совокупности с известными данными о том, что уровень экскреции L-FABP и NGAL коррелирует со степенью тубулоинтерстициального повреждения [190], полученные нами результаты подтверждают данные, что канальцевое повреждение развивается на самых ранних стадиях формирования диабетической дисфункции [6, 40, 204]. Значимая ассоциация уровня канальцевых маркеров с клубочковыми показателями (АКС, рСКФ, экскреция коллагена IV/Кр.) подтверждает тот факт, что эти морфологические изменения происходят параллельно друг другу.

Другой исследованный нами мочевой биомаркер коллаген IV/Кр. не показал диагностической ценности в раннем выявлении повреждения почек при СД 2 типа, значимо повышаясь у больных СД 2 типа только при повышении АКС и снижении рСКФкр. Схожие данные получены в исследованиях ряда других авторов [37, 194, 203,]. Так, Sawood J. et al. (2010) сообщают о значимом повышении экскреции коллагена IV/Кр. у 351 пациента с СД 2 типа только начиная с микроальбуминурической стадии ДН по сравнению с 19 участниками без нарушений углеводного обмена [194]. Но при этом экскреция коллагена IV/Кр. слабо коррелировала с выраженностью альбуминурии (коэффициент корреляции Пирсона  $<0,2$ ,  $p<0,001$ ). В другой работе, выполненной Климонтовым В.В и соавт. (2015), также не было выявлено значимой разницы в экскреции коллагена IV типа при нормальных показателях альбуминурии у больных СД 2 типа в сравнении с группой здорового контроля [37]. Поскольку молекула коллагена IV типа имеет крупную молекулярную массу, вероятнее всего, только на поздних стадиях ДН имеет место фильтрация этого белка из сыворотки крови. Тогда как на ранних стадиях, вероятнее всего, источником коллагенурии является экстракапиллярная часть ГБМ (преимущественно) и тубулярная базальная мембрана, повреждённые гипергликемией [196]. Отчасти этим и объясняется, вероятно, подтверждённая в нашей и в других работах зависимость экскреции коллагена IV типа от маркера клубочкового повреждения АКС [37, 52, 65, 66, 154, 196]. Наиболее крупным из этих работ является Азиатское мультицентровое исследование Tomino Y. et al. (2001), включавшее около 698 больных СД 2 типа и 191 участника группы контроля без СД 2 типа [52]. Как и в исследовании Климонтова В.В. и соавт. (2015), в нашей работе выявлено, что мочевая экскреция коллагена IV типа положительно коррелировала с альбуминурией и отрицательно – со СКФ, рассчитанной по цистатину С [37]. Кроме того, имелась значимая отрицательная корреляция с рСКФкр, что отмечалось многими исследователями [37, 52, 91, 203].

Существенная разница, выявленная при определении СКФ, рассчитанной различными методиками (рСКФкр, рСКФцис, рСКФкр-цис), ранее была описана в

литературе [61], в том числе у пациентов с СД 2 типа [37]. По данным исследования Inker L.A. et al. (2012), за счёт меньшей зависимости уровня цистатина С от пола, возраста, мышечной массы и характера питания определение рСКФцис может давать дополнительные преимущества в диагностике снижения фильтрационной способности почек [14, 61]. Обнаруженная в нашем исследовании более сильная связь экскреции всех исследуемых мочевых маркеров с рСКФцис, а не с рСКФкр, может быть объяснена прогностической значимостью этих мочевых показателей. Так, уровень рСКФцис более значимо ассоциирован со смертностью по сравнению с рСКФкр [103], а для исследуемых мочевых маркеров также показана возможность их использования для прогнозирования риска смерти, развития терминальной почечной недостаточности или ежегодного снижения почечной функции [91, 95].

В отличие от ранее проведённых исследований, мы продемонстрировали, что высокие уровни NGAL/Кр., независимо от уровня АКС, могут свидетельствовать о снижении рСКФцис. Результаты исследования Inker L.A. et al. (2012) показали, что расчёт рСКФцис может быть полезным для дополнительного скрининга на ХБП среди пациентов с рСКФкр от 60 до 74 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> [61]. Таким образом, выявление повышенного уровня NGAL/Кр. у больных СД 2 типа, даже при нормальных значениях АКС, может свидетельствовать о развитии раннего поражения почек и являться основанием для определения уровня цистатина С с расчётом СКФ на его основе для дополнительного скрининга на ХБП.

Другой важной проблемой практической диабетологии на современном этапе является персонализированный подбор оптимальной лечебной тактики ведения сахарного диабета 2 типа, в том числе с позиции влияния на почечную функцию [41]. В этой связи выбору сахароснижающего препарата с благоприятными почечными эффектами, особенно у пациента с ДН или факторами риска её формирования, отводится ведущая роль.

В нашей работе, как во многих клинических исследованиях, продемонстрированы позитивные свойства метформина в отношении преодоления инсулинорезистентности, ожирения и дислипидемии [67, 81, 158].



Несмотря на то, что данные факторы вносят значимый вклад в развитие и прогрессирование почечной дисфункции [42, 191], мы не выявили значимого улучшения на фоне терапии метформинем рутинных почечных показателей (рСКФкр и АКС). Кроме того, в группе больных СД 2 типа И+М статистически незначимым оказалось снижение как систолического, так и диастолического АД за 6 месяцев наблюдения.

В ряде крупных исследований также оценивался эффект назначения метформина на показатели почечной функции. Так, анализ результатов 5-летнего наблюдения за пациентами с СД 2 типа с умеренным ожирением, участвовавшими в исследовании ADOPT, 1454 из которых были рандомизированы получать в качестве стартовой терапии метформин в дозе 2000 мг/сутки, не показал значимой способности препарата, по сравнению с терапией росиглитазоном, замедлять нарастание альбуминурии и снижение СКФ (рассчитанную по формуле MDRD) [158]. Схожие данные получены в ходе анализа 10-летнего наблюдения пациентов, участвовавших в UKPDS: не было выявлено существенного влияния терапии метформинем на уровень креатинина и АКС по сравнению с монодиетотерапией [215]. Тем не менее, ухудшения почечной функции у пациентов, принимавших метформин, также не зафиксировано. На фоне 6-месячного добавления метформина мы обнаружили значимое снижение рСКФкр-цис и близкое к значимому снижение рСКФкр ( $p=0,073$ ) без существенного влияния на уровень АКС. Возможным объяснением выявленному небольшому снижению фильтрационной способности почек может служить механизм действия метформина, связанный с активацией АМФК [134]. Не исключено, что в условиях ишемии и гипоксии, неизбежно развивающихся локально в почечной ткани при СД [189], временное снижение функциональной активности почек за счёт активации АМФК может являться своеобразным защитным механизмом, сохраняющим функцию органа в долгосрочной перспективе [46, 49, 145, 167, 189]. Это предположение подтверждают результаты ретроспективного анализа данных более 60 тысяч пациентов, включенных в американскую базу данных ветеранов [67]. Полученные Hung A. et

al. (2012) результаты свидетельствовали о том, что терапия метформином в качестве стартового сахароснижающего препарата, по сравнению с препаратами группы сульфонилмочевины, не ассоциирована с повышенными рисками снижения СКФ и/или возникновения терминальной почечной недостаточности [67]. На настоящий момент существует только одно небольшое по объёму выборки исследование Amador-Licona N. et al. (2000), в котором показана способность метформина значимо снижать альбуминурию на фоне 12 недель терапии в субмаксимальной дозе после приёма глибенкламида [183]. Исследователи связали наблюдаемый эффект с позитивным влиянием метформина на показатели углеводного обмена, метаболический статус и со снижением АД, отмеченным в группе назначения препарата [183].

В нашей работе также показано положительное влияние добавления метформина в отношении веса, показателей гликемии и липидограммы. Но, в отличие от вышеупомянутых исследований, в нашей работе препарат назначался пациентам с СД 2 типа на инсулинотерапии, многим из которых она рекомендовалась после длительного стажа приёма пероральных сахароснижающих препаратов или на фоне возникновения в прошлом острых сердечно-сосудистых событий (инфаркт миокарда, ОНМК и т.п.). В схожем по дизайну исследовании De Jager J. et al. (2005) с участием 353 пациентов с СД 2 типа на инсулинотерапии, рандомизированных продолжать её или получать дополнительно метформин в дозе 2550 мг/сутки в течение 4 месяцев, исследовалось влияние препарата на маркеры эндотелиальной дисфункции и системного воспаления [87]. Обращало на себя внимание, что несмотря улучшение показателей гликемического контроля, липидограммы и снижение потребности в инсулине, в группе добавления метформина было выявлено близкое к значимому нарастание альбуминурии (на 21%,  $p=0,06$ ). Однако, в отличие от нашей работы, в исследовании De Jager J. et al. включались больные СД 2 типа с неудовлетворительными показателями гликемии (гликемия натощак выше 10 ммоль/л), имеющие плохо скорректированные цифры АД (АД выше

160/85 мм рт ст) при низкой доле адекватной антигипертензивной терапии [87]. Эти факторы самостоятельно могли способствовать нарастанию альбуминурии.

Несмотря на отсутствие улучшения рутинных почечных показателей на фоне добавления метформина, нами впервые продемонстрировано значимое снижение экскреции маркеров канальцевого повреждения у больных СД 2 типа (L-FABP/Кр. и NGAL/Кр.), ассоциированное с изменением гликемических показателей и снижением массы тела. Влияние улучшения метаболических показателей на уменьшение канальцевого почечного повреждения закономерно с точки зрения патогенеза ДН. Метаболические факторы, наряду с гипергликемией и гипертензией, являются активаторами локальной РААС в тубулоинтерстиции. Активация рецепторов ангиотензина приводит к пролиферации фибробластов с последующим увеличением синтеза белков межклеточного матрикса (в частности, коллагенов), стимуляции окислительного стресса и образованию провоспалительных цитокинов, а через активацию эндотелина – к индукции ишемии и ещё большему усугублению формирования тубулоинтерстициального фиброза [12, 172]. Таким образом, резонна возможность ослабления проявлений канальцевых нарушений на фоне улучшения метаболического контроля, что было отчётливо продемонстрировано в нашем экспериментальном исследовании на фоне терапии как метформином, так и вилдаглиптином. Поскольку источником образования L-FABP в организме, помимо канальцев почек, является также печень [93], возможным объяснением снижения мочевой экскреции L-FABP у больных СД 2 типа при добавлении метформина могло бы являться его известное позитивное влияние в отношении печёночной функции [59]. Однако в исследовании с участием пациентов с ХБП было показано, что сывороточный уровень L-FABP практически не влияет на его мочевую экскрецию, в связи с чем L-FABP первично попадает в мочу из повреждённых канальцев почек [199].

Выявленное при добавлении метформина снижение экскреции NGAL частично может быть объяснено эффектом препарата в отношении гликемического контроля. Продemonстрированная в нашей работе прямая зависимость изменения экскреции NGAL от изменения частоты

гипогликемических эпизодов и обратная – от динамики гликемии натощак подтверждает известный факт, что гипогликемия является важным фактором риска почечной дисфункции [37, 191] и может приводить к непосредственному повреждению канальцев почек. Тем не менее, не исключён и прямой протекторный эффект метформина в отношении канальцевых эпителиоцитов, продемонстрированный в ряде экспериментальных работах Takiyama Y. et al. (2011) и Ishibashi Y. et al. (2012) [189, 214].

В качестве одного из потенциальных механизмов защиты канальцевых эпителиоцитов в исследовании Takiyama Y. et al. (2011) рассматривается способность метформина уменьшать экспрессию индуцируемого при гипоксии фактора-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), снижая потребность в кислороде и предотвращая тем самым канальцевое повреждение [189]. У крыс линии Zucker Diabetic Fatty это проявлялось в ослаблении выраженности тубулоинтерстициального фиброза после 30-недельной терапии метформином в дозе 250 мг/кг [189]. В ряде других экспериментальных работ на культуре клеток и на моделях СД у грызунов продемонстрирована способность метформина предотвращать повреждение других почечных структур за счёт уменьшения процессов воспаления, гликооксидации, фиброзирования и окисления липидов [136, 160, 214].

В нашем экспериментальном исследовании метформин значимо не влиял на клиренс креатинина и уровень альбуминурии, однако, эти показатели были ниже, чем в контрольной группе крыс с СД 2 типа, не получавших лечения. Кроме того, морфологические изменения на фоне терапии метформином также не достигали статистической значимости при морфометрическом сравнении с животными контрольной группы с СД 2. Полученные нами результаты несколько отличаются от описанных в зарубежной литературе. Так, в работе Kim J. et al. (2012) у крыс линии Spontaneously Diabetic Torii, спонтанно развивающих СД 2 типа без ожирения, продемонстрировано значимое снижение альбуминурии [160]. В исследовании Alhaider A. et al. (2011) на крысах со СТЗ-индуцированным СД (модель СД 1 типа) – значимое снижение альбуминурии с одновременным уменьшением креатинина сыворотки на терапии метформином,

сопровождается ослаблением выраженности диабет-индуцированного оксидативного стресса [136]. При этом улучшение почечной функции было ассоциировано с уменьшением экспансии мезангиального матрикса, толщины ГБМ и повреждения подоцитов [136, 160]. Однако в описываемых исследованиях использовались модели СД у крыс, в которых основным повреждающим фактором являлась выраженная гипергликемия с показателями глюкозы крови натощак 20 ммоль/л и выше, что не позволяет однозначно экстраполировать полученные данные на клиническую ситуацию при СД 2 типа [136, 160]. Мы не получили статистически значимого уменьшения клубочковых склеротических изменений и степени тубулоинтерстициального фиброза при световой микроскопии, что может быть связано с меньшей продолжительностью периода назначения метформина по сравнению с работами Alhaider A.A. et al. и Kim J. et al.

В нашем исследовании в группе лечения крыс метформином, несмотря на отсутствие значимого изменения рутинных почечных показателей, впервые было выявлено снижение экскреции маркеров канальцевого повреждения KIM-1 и NGAL. Полученные нами данные подтверждают результаты исследований на культуре клеток и в эксперименте на моделях СД 2 типа у крыс, демонстрирующие способность метформина уменьшать прямое повреждение эпителиоцитов проксимальных канальцев [189, 214]. В совокупности с полученными в клиническом разделе диссертации данными, это может свидетельствовать о наличии у метформина протективных свойств в отношении диабетического канальцевого почечного повреждения.

Другим препаратом, исследованным в нашей работе на предмет метаболических и почечных эффектов, являлся вилдаглиптин. Полученные нами результаты в экспериментальном исследовании в отношении снижения альбуминурии, улучшении клиренса креатинина и ослабления морфологических клубочковых почечных изменений не противоречат мировым литературным источникам. Так, в работе Liu W.J. et al. (2012) было показано, что терапия вилдаглиптином в дозе 8 мг/кг, назначенная сразу после манифестации

стрептозотоцинового СД 1 типа у крыс Sprague-Dawley, за 24 недели приводила к уменьшению альбуминурии и креатинина сыворотки. При этом значимые структурные изменения в почечной ткани выявлялись только на ультраструктурном уровне [75]. Обнаруженные нефропротективные свойства препарата не зависели от сахароснижающего эффекта вилдаглиптина и были ассоциированы со снижением гиперпродукции трансформирующего ростового фактора  $\beta$ -1, выполняющего функцию контроля клеточного роста, клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток [75]. Возможность торможения развития гломерулосклероза на терапии вилдаглиптином показана также у крыс с генетически-обусловленным СД на фоне ожирения в работе Vavrinec P. et al. (2014) [207]. Также протективные свойства вилдаглиптина показаны в исследованиях на моделях нефропатии недиабетического генеза, что отражено в обзоре Корбут А.И., Климонтов В.В. (2016) [16]. Принципиальным отличием нашей работы от выполненных зарубежными коллегами является использование более валидной негенетической экспериментальной модели СД 2 типа.

Продемонстрированные ранее в экспериментальных исследованиях нефропротективные свойства вилдаглиптина связывают как с воздействием на рецепторы ГПП-1, обнаруженные в почечной ткани [16, 98], так и с инкретин-опосредованным действием [16, 102, 149]. Известно, что фермент ДПП-4 проявляет иммуномодулирующие свойства, участвует в деградации ряда нейро- и регуляторных пептидов и гормонов. Эти субстраты обладают натрийуретическими, противовоспалительными, антиоксидантными и сосудорасширяющими свойствами [16, 118]. Все эти в совокупности свойства, вероятно, позволили вилдаглиптину реализовать плейотропный потенциал преимущественно в отношении клубочков почек, что было подтверждено в нашем экспериментальном исследовании посредством комплекса лабораторных и морфологических методов, а также показано в клиническом исследовании.

Полученные нами результаты в отношении метаболических и гемодинамических эффектов добавления вилдаглиптина пациентам с СД 2 типа

на инсулинотерапии (в виде улучшения контроля гликемии, снижения суточной потребности в инсулине и умеренного снижения диастолического АД) в целом не противоречат описанным на сегодняшний день в литературе [80, 89, 90]. С практической точки зрения очень важное значение имеет показанное в нашей работе снижение частоты гипогликемических эпизодов на фоне добавления вилдаглиптина больным СД 2 типа, получающим инсулинотерапию. Гипогликемия является не только значимой составляющей качества жизни пациентов с СД, но и независимым фактором риска сердечно-сосудистых катастроф, повышения креатинина крови и снижения рСКФ [13, 35, 181]. В исследовании Okajima F. et al. (2017) на комбинированной терапии инсулином в базис-болюсном режиме и вилдаглиптином в дозе 100 мг в сутки, наряду с улучшением показателей гликемического контроля, продемонстрировано снижение вариабельности гликемии. Это сопровождалось уменьшением частоты гипогликемий в сравнении с контрольной группой продолжения инсулинотерапии [80].

В нашем исследовании продемонстрировано умеренное снижение уровня триглицеридов и, в меньшей степени, общего холестерина на терапии вилдаглиптином, а также значимое снижение диастолического АД на 4,0 [-6,0; -3,0] мм рт. ст. В объединённом анализе Evans M. et al. (2016), изучавшем влияние 6-месячного назначения вилдаглиптина в дозе 50 или 100 мг/сутки более чем 2000 больным СД 2 типа, также продемонстрирована способность препарата снижать показатели липидного спектра ( $p < 0,001$ ), систолическое АД (с  $132,5 \pm 0,3$  до  $129,8 \pm 0,3$  мм рт. ст.,  $p < 0,001$ ), диастолическое АД (с  $81,2 \pm 0,2$  до  $79,6 \pm 0,2$  мм рт. ст.,  $p < 0,001$ ), а также вес тела [90]. Описанный в литературе вес-снижающий эффект препарата мы не наблюдали. Однако важно учитывать, что препарат назначался не в максимальной дозе пациентам, получавшим инсулинотерапию, одним из значимых побочных эффектов которой является набор веса [1]. Мы не оценивали в работе индекс инсулинорезистентности НОМА-IR у больных СД 2 типа, поскольку, по данным Wallace T.M. et al., известные формулы для расчёта индекса инсулинорезистентности не валидированы у больных СД 2 типа,

получающих терапию инсулином [73]. Однако косвенно о снижении инсулинорезистентности может свидетельствовать сопоставимое уменьшение суточной дозы получаемого инсулина в группе И+В и И+М за период 6-месячного назначения препаратов. Тем не менее, в большинстве работ с участием больных СД 2 типа значимого влияния терапии вилдаглиптином на индекс НОМА-IR не обнаружено [2, 7]. Выявленный в нашем клиническом исследовании умеренный гипотензивный эффект добавления вилдаглиптина и обратная значимая умеренная зависимость изменения рСКФцис от динамики систолического АД может свидетельствовать о том, что почечные эффекты вилдаглиптина могут частично реализовываться за счёт гемодинамического компонента.

Выявленное при добавлении вилдаглиптина снижение альбуминурии (на 12,2%), продемонстрированное также в клинических исследованиях Xidakis D. et al. (2015) и Tani S. et al. (2013), в нашей работе не достигало статистической значимости [45, 177]. Результаты этих работ перекликаются с исследованием Watanabe M. et al. (2012) с участием более ста больных СД 2 типа с разной степенью ХБП, включая терминальную. В нём продемонстрировано снижение альбуминурии на начальных стадиях ДН при назначении вилдаглиптина в дозе 50 мг в сутки на 6 месяцев [209]. Однако в работе не сообщается о показателях гликемического контроля и предшествующей сахароснижающей терапии. Кроме того, все вышеупомянутые исследования являлись неконтролируемыми, что не позволяет исключить возможность спонтанного изменения оцененных показателей.

Таким образом, факт даже незначимого снижения АКС наряду с глюкозозависимым снижением экскреции коллагена IV типа на фоне добавления вилдаглиптина свидетельствует об уменьшении клубочкового почечного повреждения и может являться проявлением нефропротективных свойств вилдаглиптина. Гипоальбуминурический эффект ингибиторов ДПП-4 продемонстрирован в крупных исследованиях для других представителей этого класса (саксаглиптина – в SAVOR-TIMI (значимый) и линаглиптина – в



MARLINA-T2D (статистически незначимое снижение)). Однако способность вилдаглиптина снижать экскрецию коллагена IV типа для представителей глиптинов показано нами впервые.

Не является до конца понятным, как интерпретировать наблюдаемое в группе добавления вилдаглиптина повышение рСКФцис и рСКФкр-цис при отсутствии значимого изменения рСКФкр. Вероятным объяснением последнего обстоятельства могут являться данные о том, что цистатин С сыворотки, в отличие от креатинина, у пациентов с СД 2 типа обеспечивает более быстрый ответ в случаях, когда происходит изменение фильтрационной функции почек [14, 68, 119]. Понимание эффекта увеличения фильтрационной способности почек на терапии вилдаглиптином является менее ясным. В крупном Японском исследовании Moriga T. et al. (2017) по изучению осложнений СД было показано, что риск ежегодного значительного снижения СКФ ( $\geq 3$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>) прямо зависел от исходного уровня фильтрационной функции (даже в пределах нормальных показателей СКФ от 60 до 120 мл/мин), при этом снижение СКФ могло происходить даже без увеличения альбуминурии [152]. В ретроспективном когортном исследовании Kolaczynski W.M. et al. (2016), включавшем более 16 тысяч больных СД 2 типа, не было продемонстрировано ухудшения почечной функции на терапии вилдаглиптином по сравнению с препаратами группы сульфонилмочевины. [139]. Более того, частота развития ДН у пациентов, получавших вилдаглиптин, была ниже, чем в группе сравнения [139]. Таким образом, очевидна необходимость проведения долгосрочных проспективных рандомизированных клинических исследований, в которых на терапии вилдаглиптином будут оценены в динамике почечная функция (с возможным применением изотопных клиренсовых методик) и эффект на жёсткие конечные точки.

## 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/1,73м<sup>2</sup> 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 показателям 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/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 СОКРАЩЕНИЙ**

АД – артериальное давление

АКС – альбумин-креатининовое соотношение (моча)

АМФК – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа

АПФ – ангиотензин-превращающий фермент

БРА – блокаторы рецепторов ангиотензина-II

ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид-1

ДН – диабетическая нефропатия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДПП-4 – дипептидил-пептидаза 4 типа

ИБС – ишемическая болезнь сердца

иДПП-4 – ингибитор дипептидил-пептидазы-4

ИМТ – индекс массы тела

ИФА – иммуноферментный анализ

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

НА – никотинамид

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система

рСКФкр – расчётная скорость клубочковой фильтрации по креатинину

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

рСКФцис – расчётная скорость клубочковой фильтрации по цистатину С

СД – сахарный диабет

СД 2 – обозначение сахарного диабета 2 типа в названиях групп

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

ССП – сахароснижающий препарат (ты)

СТЗ – стрептозотонин

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХБП – хроническая болезнь почек

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЧСС – частота сердечных сокращений

ШИК – реакция Шифф-йодной кислотой

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

НбА1с – гликированный гемоглобин

НОМА-ІR – 0,46гомеостатическая модель оценки инсулинорезистентности (The Homeostasis Model Assessment of insulin resistance)

КІМ-1 – молекула повреждения почек-1(kidney injury molecule-1)

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

L-FABP – печеночная форма белка, связывающая жирные кислоты (liver fatty acid-binding protein)

L-FABP /Кр. – соотношение уровня печеночная форма белка, связывающей жирные кислоты, к креатинину мочи

MDRD – изменение диеты при заболеваниях почек (Modification of Diet in Renal Disease)

mTOR – мишень для рапамицина у млекопитающих (mammalian target of rapamycin)

NGAL – ассоциированный с нейтрофильной желатиназой липокалин (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. 8-й выпуск / под ред. И.И.Дедова, М.В.Шестаковой, А.Ю.Майорова // Сахарный диабет. – 2017. Т. 20, № 1S. – С. 1-121.
2. Аметов, А.С. Клиническое использование ингибитора ДПП-4 – вилдаглиптина при сахарном диабете 2 типа / А.С.Аметов, Е.В.Карпова // РМЖ. – 2010. – № 14. – С. 887-891.
3. Бобкова, И.Н. Диабетическая нефропатия - фокус на повреждение подоцитов / И.Н.Бобкова, М.В.Шестакова, А.А.Щукина // Нефрология. – 2015. – Т. 19, № 2. – С. 33-44.
4. Бондарь, И.А. Ранние маркеры диабетической нефропатии / И.А.Бондарь, В.В.Климонтов // Клиническая нефрология. – 2010. – № 2. – С. 60-65.
5. Вельков, В.В. NGAL - "Ренальный тропонин": ранний маркер острого повреждения почек (Часть 2) / В. В. Вельков // Лабораторна діагностика. – Киев, 2012. - № 2. – С. 46-55.
6. Вельков, В.В. Новые представления о диабетической нефропатии: гиперфльтрация, прерывистая микроальбуминурия, солевой парадокс / В.В.Вельков // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. – 2013. – № 3. – С. 18-36.
7. Влияние ингибиторов дипептидилпептидазы-4 на функциональное состояние миокарда у больных сахарным диабетом 2 типа / А.С.Аметов [и др.] // Фарматека. – 2012. – № 10 (243). – С. 79-86.
8. Дедов, И.И. Инкретины: новая веха в лечении сахарного диабета 2 типа : рук. / И.И.Дедов, М.В.Шестакова. – М.: Изд-во «Дипак», 2010. – 92 с.
9. Диагностическая и прогностическая ценность биомаркеров повреждения почечных канальцев NGAL, KIM-1, L-FABP у пациентов с хронической болезнью почек / О.Б.Кузьмин [и др. ] // Нефрология. – 2017. – Т. 21, № 2. – С. 24-32.

10. Диагностический протеомный профиль мочи у пациентов с диабетической нефропатией I стадии при сахарном диабете 2-го типа / В.М.Ибрагимов [и др.] // Нефрология. – 2016. – Т. 20, № 5. – С. 69-74.
11. Добронравов, В.А. Многогранная альбуминурия: аспекты клинического значения / В.А.Добронравов, А.В.Смирнов, И.Г.Каюков // Нефрология. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 33-39.
12. Есаян, А.М. Тканевая ренин-ангиотензиновая система почки. Новая стратегия нефропротекции / А.М.Есаян // Нефрология. – 2008. – Т. 6, № 3. – С. 8-16.
13. Качество жизни и проблемы, связанные с гипогликемией, у больных сахарным диабетом 2-го типа на фоне базис-болюсной терапии инсулином / Т.И.Ионова [и др.] // Клиническая медицина. – 2014. – Т. 92, № 10. – С. 52-59.
14. Каюков, И.Г. Цистатин С в современной медицине / И.Г.Каюков, А.В.Смирнов, В.Л.Эмануэль // Нефрология. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 22-39.
15. Климонтов, В.В. Взаимосвязь вариабельности уровня глюкозы и функции почек у больных сахарным диабетом 2 типа на базис-болюсной инсулинотерапии / В.В.Климонтов, Н.Е.Мякина // Сахарный диабет. – 2015. – Т.18, №4. – С. 66-71.
16. Корбут, А.И. Терапия, основанная на инкретинах: почечные эффекты / А.И.Корбут, В.В.Климонтов // Сахарный диабет. – 2016. – Т.19, № 1. – С. 53-63.
17. Кравчук, Е.Н. Применение метформина при сочетании ишемической болезни сердца и сахарного диабета 2 типа: механизмы действия и клиническая эффективность / Е.Н.Кравчук, М.М.Галагудза // Сахарный диабет. – 2013. – № 1. – С. 5-14.
18. Лебедева, Н.О. Маркеры доклинической диагностики диабетической нефропатии у пациентов с сахарным диабетом 1 типа / Н.О.Лебедева, О.К.Викулова // Сахарный диабет. – 2012. – № 2. – С. 38–45.
19. Маньковский, Б.Н. Распространенность поражения почек у больных сахарным диабетом 2 типа, по данным эпидемиологического исследования

- СКИФ / Б.Н.Маньковский, Д.Д.Иванов // Сердце и сосуды. – 2009. – № 4 (28). – С. 45-49.
20. Маслова О.В. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений / О.В.Маслова, Ю.И.Сунцов // Сахарный диабет. – 2011. – № 3. – С. 6-11.
21. Мочевая экскреция коллагена IV типа – ранний маркер фиброзирования почек при сахарном диабете / И.А.Бондарь [и др.] / Сахарный диабет. – 2011. – № 4. – С. 29-31.
22. Нагибович, О.А. Состояние сердечно-сосудистой системы при диабетической нефропатии: автореф. дис... д-ра мед. наук: 14.00.05 / О.А.Нагибович. – Санкт-Петербург: ВМА им. С.М.Кирова, 2004. – 35 с.
23. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению / А.В.Смирнов [и др.] // Нефрология. – 2012. – Т.16, № 1. – С. 89–115.
24. Ожирение – фактор риска поражения почек у больных сахарным диабетом 2 типа / С.А. Савельева [и др.] // Сахарный диабет. – 2010. – № 2. – С. 45-49.
25. Патогенетические факторы и клинические особенности анемии у пациентов с ранними стадиями диабетической нефропатии / И.Ю.Пчелин [и др.] // Научный аспект. – 2015. – Т. 2, № 3. – С. 258-270.
26. Пигарова, Е.А. Механизмы, лежащие в основе метформин-индуцированной секреции глюкагоноподобного пептида-1/ Е.А.Пигарова // Ожирение и метаболизм. – 2011. – № 4. – С. 50-51.
27. Пупышев, А.Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты / А.Б.Пупышев // Цитология. – 2014. – Т. 3, № 56. – С. 179-196.
28. Пчелин, И.Ю. Роль системного и локального воспаления в развитии диабетической нефропатии / И.Ю.Пчелин, А.Н.Шишкин, О.А.Лаптева // Нефрология. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 21-26.
29. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Н.Д.Бунятян [и др.]; под ред. А.Н.Миронова. – М.:



- Гриф и К., 2012. – 944 с.
30. Способ моделирования полиорганной патологии у крыс: пат. 2453002 Рос. Федерация: МПК G 09 В 23/28, 2006.01 / Караман Ю.К. [и др.]; заявитель и патентообладатель ДНЦ ФПД СО РАМН. – № 2011100502/14; заявл. 11.01.11; опубл. 10.06.12, Бюл. № 16. 15 с: 3 табл., 3 ил.
  31. Тюзиков, И.А. Инсулинорезистентность как системный фактор патогенеза заболеваний почек / И.А.Тюзиков // Сахарный диабет. – 2014. – № 1. – С. 47-56.
  32. Факторы риска прогрессирования диабетической нефропатии у больных с длительным течением сахарного диабета по данным ретроспективного анализа / М.В. Шестакова [и др.]// Тер. арх. – 2006. – № 5. – С. 26-28.
  33. Фармакоэпидемиологический анализ потребления сахароснижающих лекарственных средств у больных сахарным диабетом 2 типа в городе Москве / М.Ф.Калашникова [и др.] // Сахарный диабет. – 2015, № 18 (2). – С. 32-46.
  34. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, скринингу, профилактике и лечению хронической болезни почек у больных сахарным диабетом / М.В. Шестакова [и др.] – М., 2014. – 39 с.
  35. Халимов, Ю.Ш. Гипогликемии как основной фактор выбора целей гликемического контроля и тактики лечения больных сахарным диабетом типа 2 / Ю.Ш.Халимов, В.В.Салухов В.В., Е.О.Улупова // Consilium Medicum. – 2012. – Т. 14, № 12. – С. 25-30.
  36. Халимов, Ю.Ш. Вилдаглиптин: место в терапии сахарного диабета / Ю.Ш.Халимов // Сахарный диабет. 2010. – № 3. – С. 92-96.
  37. Цистатин С и коллаген IV типа в диагностике хронической болезни почек у больных сахарным диабетом 2 типа / В.В.Климонтов [и др.] // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18, № 1. – С. 87-93.
  38. Чазова, И.Е. Артериальная гипертония, курение, почки - что общего? Результаты исследования ИРИС/ И.Е.Чазова, Л.Г.Ратова // Системные гипертензии. – 2008. – № 2. – С. 60-63.

39. Шамхалова, М.Ш. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 в терапии больных сахарным диабетом 2-го типа и с хронической болезнью почек / М.Ш.Шамхалова, М.В.Шестакова // Проблемы эндокринологии. – 2012. – Т. 58, № 6. – С. 43-48.
40. Шамхалова, М.Ш. Факторы тубулоинтерстициального поражения почек при сахарном диабете / М.Ш.Шамхалова, К.О.Курумова, М.В.Шестакова // Сахарный диабет. – 2009. – № 4. – С. 61-65.
41. Шестакова, М.В. Выбор безопасной сахароснижающей терапии при поражении почек у больных сахарным диабетом / М.В. Шестакова // Consilium medicum. – 2009. – Т. 11. – № 12.
42. Шестакова, М.В. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек / М.В. Шестакова, И.И. Дедов. – М.: Изд-во «Медицинское информационное агентство», 2009. – 482 с.
43. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А.А.Спасов [и др.] // Биомедицина. – 2011. – Т. 1, № 3. – С. 12-18.
44. An Atherogenic Paigen-Diet Aggravates Nephropathy in Type 2 Diabetic OLETF Rats [Electronic resource] / M.Nozako [et al.] // PLoS One. – 2015. –Vol. 10, № 11. – P. e0143979. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4659596/>
45. A DPP-4 inhibitor, vildagliptin is effective in reducing albuminuria in early stages of diabetic nephropathy / D. Xidakis [et al.] // Nephrol Dial Transplant. – 2015. – Vol. 30, Suppl. 3. – P.iii535.
46. A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy / M.J.Lee [et al.] // Am J Physiol Renal Physiol. – 2007. – Vol. 292, № 2. – P. 617-627.
47. Abroma augusta (Malvaceae) leaf extract attenuates diabetes induced nephropathy and cardiomyopathy via inhibition of oxidative stress and inflammatory response / R. Khanra [et al.] // J Transl Med. – 2015. – Vol. 13. – P. 6.
48. Accelerated decline of renal function in type 2 diabetes following severe hypoglycemia / T.Tsujimoto [et al.] // J Diabetes Complications. – 2016. – Vol. 30,

- № 4. – P. 681-685.
49. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits ER stress and renal fibrosis / H.Kim [et al.] // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2015. – Vol. 308, № 3. –P. 226-236.
  50. Addition of metformin to exogenous glucagon-like peptide-1 results in increased serum glucagon-like peptide-1 concentrations and greater glucose lowering in type 2 diabetes mellitus / J.Cuthbertson [et al.] // *Metabolism.* – 2011. – Vol. 60, № 1. – P. 52-56.
  51. Allen, T.J. Use of genetic mouse models in the study of diabetic nephropathy / T.J. Allen, M.E.Cooper, H.Y.Lan // *Curr Diab Rep.* – 2004. – Vol. 4, № 6. – P. 435-440.
  52. Asian multicenter trials on urinary type IV collagen in patients with diabetic nephropathy / Y.Tomino [et al.] // *J Clin Lab Anal.* – 2001. – Vol. 15, №. 4. – P. 188–192.
  53. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study / I.M.Stratton [et al.] // *BMJ.* – 2000. – Vol. 321(7258). – P. 405-412.
  54. Attenuation of renovascular damage in Zucker diabetic fatty rat by NWT-03, an egg protein hydrolysate with ACE- and DPP4-inhibitory activity [Electronic resource] / Y.Wang [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. e46781. – Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046781>
  55. Avogaro, A. The effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on microvascular diabetes complications / A.Avogaro, G.P.Fadini // *Diabetes Care.* – 2014. – Vol. 37, № 10. – P. 2884-2894.
  56. Bakris, G.L. Microalbuminuria as a risk predictor in diabetes: the continuing saga / G.L.Bakris, M.Molitch // *Diabetes Care.* – 2014. – Vol. 37. – P. 867-875.
  57. Cardiovascular and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes mellitus in the MADIABETES cohort study: association with chronic kidney disease /

- M.Á.Salinero-Fort [ et al.] // *Diabetes Complications*. – 2016. – Vol. 30, № 2. – P. 227-236.
58. CDK5 promotes renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy via ERK1/2/PPAR $\gamma$  pathway / X. Bai [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 24. – P. 36510-36528.
59. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview / B.Viollet [et al.] // *ClinSci (Lond)*. – 2012. – Vol. 122, № 6. – P. 253-270.
60. Characterization of the ZDSD rat: a translational model for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes [Electronic resource] / R.G, Peterson [et al.] // *J Diabetes Res*. – 2015. – 2015. – P. 487816. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2015/487816/>
61. CKD-EPI Investigators. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C / L.A.Inker [et al.] // *N Engl J Med*. – 2012. – Vol. 367, № 1. – P. 20-29.
62. Clinical predictive factors in diabetic kidney disease progression / N.J.Radcliffe [ et al.] // *J Diabetes Investig*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 6-18.
63. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid binding protein at various stages of nephropathy / V. Viswanathan [et al.] // *Indian J Nephrol*. – 2015. – Vol. 25, № 5. – P. 269-273.
64. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in diabetic nephropathy of type 2 diabetic patients / A.Kamijo-Ikemori [et al.] // *Diabetes Care*. – 2011. – Vol 34, № 3. – P. 691-696.
65. Clinical usefulness of measurement of urine type IV collagen for detection of early phase of nephropathy in type 2 diabetic patients / M.Inoue [et al.] // *RinshoByori*. – 2008. –Vol.56, № 7. – P. 564-569.
66. Cohen-Bucay, A. Urinary markers of glomerular injury in diabetic nephropathy [Electronic resource] / A.Cohen-Bucay, G.Viswanathan // *Int J Nephrol*. – 2012. – 2012. – P. 146987. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/ijn/2012/146987/>
67. Comparative effectiveness of incident oral antidiabetic drugs on kidney function in

- Veterans with type 2 diabetes / A.M.Hung [et al.] // *Kidney Int.* – 2012. – Vol. 81. – P. 698–706.
68. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients / M. Mussap [et al.] // *Kidney Int.* – 2002. Vol. 61, № 4. – P. 1453-1461.
69. Derosa, G. Vildagliptin action on some adipocytokine levels in type 2 diabetic patients: a 12-month, placebo-controlled study / G.Derosa [et al.] // *Expert Opin Pharmacother.* – 2012. – Vol. 13, № 18. – P. 2581-2591.
70. Desai, N.R. Patterns of medication initiation in newly diagnosed diabetes mellitus: quality and cost implications / N.R.Desai [et al.] // *Am J Med.* – 2012. – Vol. 125, № 3. – P. 1-7.
71. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference / K.R.Tuttle [et al.] // *Diabetes Care.* – 2014. – Vol. 37. – P. 2864-2883.
72. Diabetic kidney disease: worldwide difference of prevalence and risk factors / O.Gheith [et al.] // *J Nephropharmacol.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 49-56.
73. Wallace, T.M. Use and abuse of HOMA modeling / T.M. Wallace, J.C.Levy, D.R.Matthews // *Diabetes Care.* – 2004. – Vol. 27, № 6. – P. 1487-1495.
74. Dipeptidyl peptidase IV inhibition exerts renoprotective effects in rats with established heart failure. D.F.Arruda-Junior [et al.] // *Front Physiol.* –2016. – Vol. 7. – P. 293.
75. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor attenuates kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats / W.J. Liu [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2012. – Vol. 340, № 2. – P. 248-255.
76. Dipeptidyl peptidase-IV expression and activity in human glomerular endothelial cells / L.Pala [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 310, № 1. – P. 28-31.
77. Dobronravov, V.A. Risk of chronic renal failure in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus with diabetic nephropathy and the stage of permanent proteinuria and arterial hypertension: role of clinical factors / V.A. Dobronravov // *Ter Arkh.* – 2000. – Vol. 72, № 6. – P. 52-54.

78. Early urinary and plasma biomarkers for experimental diabetic nephropathy / M.L.Alter [et al.] // *Clin Lab.* – 2012. – Vol. 58, № 7-8. – P. 659-671.
79. Effect of fenofibrate and metformin on lipotoxicity in OLETF rat kidney / W.Wang [et al.] // *Beijing Da Xue Xue Bao.* – 2006. – Vol. 38, № 2. – P. 170-175.
80. Effect of glycemic control on chylomicron metabolism and correlation between postprandial metabolism of plasma glucose and chylomicron in patients with type 2 diabetes treated with basal-bolus insulin therapy with or without vildagliptin / F.Okajima [ et al.] // *J Atheroscler Thromb.* – 2017. – Vol. 24, № 2. – P. 157-168.
81. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) / UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group.) // *Lancet.* – 1998. – Vol. 352(9131). – P. 854-865.
82. Effect of the duration of high-fat diet and the dosage of streptozotocin on establishing experimental animal model of type 2 diabetes mellitus / B.Wang [et al.] // *Wei Sheng Yan Jiu.* – 2011. – Vol. 40, № 1. – P. 99-102.
83. Effect of vildagliptin on hsCRP and arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus / I.Zografou [et al.] // *Hormones (Athens).* – 2015. – Vol. 14, № 1. – P. 118-125.
84. Effectiveness and safety of metformin in 51 675 patients with type 2 diabetes and different levels of renal function: a cohort study from the Swedish National Diabetes Register [ Electronic resource] / N.Ekström [et al.] // *BMJ Open.* – 2012. – Vol. 2, № 4. –P. e001076. – Available at: <http://bmjopen.bmj.com/content/2/4/e001076>
85. Effects of ferulic acid on diabetic nephropathy in a rat model of type 2 diabetes / R.Choi [et al.] // *Exp Mol Med.* – 2011. – Vol. 43, № 12. – P. 676-683.
86. Effects of intensive glucose control on microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of individual participant data from randomised controlled trials / S.Zoungas [et al.] // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2017. – Vol. 5, № 6. – P. 431-437.
87. Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-

- controlled trial / J.De Jager [ et al. ] // J Intern Med. – 2005. – Vol. 257, № 1. – P.100-109.
88. Effects of the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor vildagliptin on incretin hormones, islet function, and postprandial glycemia in subjects with impaired glucose tolerance / J.Rosenstock [et al.] // Diabetes Care. – 2008. – Vol. 31, № 1. – P. 30-35.
89. Efficacy of vildagliptin in combination with insulin in patients with type 2 diabetes and severe renal impairment / V. Lukashevich [et al.] // Vasc Health Risk Manag. – 2013. – Vol. 9. – P. 21-28.
90. Evans, M. Blood pressure and fasting lipid changes after 24 weeks' treatment with vildagliptin: a pooled analysis in >2,000 previously drug-naïve patients with type 2 diabetes mellitus / M.Evans, A.Schweizer, J.E.Foley // Vasc Health Risk Manag. – 2016. – Vol. 12. – P. 337-340.
91. Factors associated with frequent remission of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes / S.Araki [et al. ] // Diabetes. – 2005. – Vol. 54. – P. 2983-2987.
92. Farr, S. Glucagon-like peptide-1 as a key regulator of lipid and lipoprotein metabolism in fasting and postprandial states / S.Farr, J.Taher, K.Adeli // Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. – 2014. – Vol. 14, № 2. – P. 126-36.
93. Fiseha, T. Urinary markers of tubular injury in early diabetic nephropathy [ Electronic resource] / T.Fiseha, Z.Tamir // Int J Nephrol. – 2016. – 2016. – P. 4647685. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/ijn/2016/4647685/>
94. Fu, W.J. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study / W.J. Fu [et al.] // Endocrine. – 2012. – Vol. 41, № 1. – P. 82-88.
95. Fufaa, G.D. Association of urinary KIM-1, L-FABP, NAG and NGAL with incident end-stage renal disease and mortality in American Indians with type 2 diabetes mellitus / G.D.Fufaa, E.J.Weil, R.G.Nelsonetal // Diabetologia. – 2015. – Vol. 58, № 1. – P.188-198.
96. Genetic predisposition to diabetic nephropathy: evidence for a role of ACE (I/D) gene polymorphism in type 2 diabetic population from Kutch region /

- D.N.Parchwani [et al.] // *Indian J Clin Biochem.* – 2015. – Vol. 30, № 1. – P. 43-54.
97. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes / F.L.Nauta [et al.] // *Diabetes Care.* – 2011. – Vol. 34, № 4. – P. 975-981.
98. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody / C.Pyke [et al.] // *Endocrinology.* – 2014. – Vol. 155, № 4. – P. 1280-1290.
99. Guide for the care and use of laboratory animals . 8th edition // Washington (DC): National Academies Press (US), 2011. – P. 1-246.
100. Gupta, V. Pleiotropic effects of incretins / V.Gupta // *Indian J Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 6, Supp.1. – P. 47–56.
101. Halcox, J. Type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, and mixed dyslipidemia: how similar, how different, and how to treat? / J.Halcox, A.Misra // *Metab Syndr Relat Disord.* – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 1-21.
102. Haluzík, M. Renal effects of DPP-4 inhibitors: a focus on microalbuminuria / M.Haluzík, J.Frolík, I.Rychlík // *Int J Endocrinol.* – 2013 (2013). – P. 895102.
103. Helmersson-Karlqvist, J. Cystatin C-based glomerular filtration rate associates more closely with mortality than creatinine-based or combined glomerular filtration rate equations in unselected patients / J.Helmersson-Karlqvist, J.Ärnlöv, A.Larsson // *Eur J Prev Cardiol.* – 2016. – Vol. 23, № 15. – P. 1649-1657.
104. High expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the kidney proximal tubules of diabetic rats / F.Liu [et al.] // *Adv Med Sci.* – 2015. – Vol. 60, № 1. – P. 133-138.
105. High-fat diet in low-dose streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: a new rat model of diabetic nephropathy / M.Sugano [ et al. ] // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2006. – Vol. 16, № 7. – P. 477-484.
106. Howey, J.E. Biologic variation of urinary albumin: consequences for analysis, specimen collection, interpretation of results, and screening programs / J.E.Howey,



- M.C.Browning, C.G.Fraser // *Am J Kidney Dis.* – 1989. – Vol. 13, № 1. – P. 35-37.
107. Human liver fatty acid binding protein cDNA and amino acid sequence. Functional and evolutionary implications / L.Chan [et al.] // *J Biol Chem.* – 1985. – Vol. 260, № 5. – P. 2629-2632.
108. Hypoglycemia and diabetes: a report of a workgroup of the American Diabetes Association and The Endocrine Society / E. R.Sequist [et al. ] // *Diabetes Care.* – 2013. – Vol. 36, № 5. – P. 1384-1395.
109. Immunodissection of the human proximal nephron: flow sorting of S1S2S3, S1S2 and S3 proximal tubular cells / M.J.Helbert [et al.] // *Kidney Int.* – 1997. – Vol. 52, № 2. – P. 414-428.
110. Increase in urinary markers during the acute phase reflects the degree of chronic tubulointerstitial injury after ischemia-reperfusion renal injury / M.Hisamichi [et al.] // *Biomarkers.* –2017. – Vol. 22, № 1. – P.5-13.
111. Insulin and metformin may prevent renal injury in young type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats / T.M. Louro [et al.] // *Insulin Eur J Pharmacol.* – 2011. – Vol. 653, № 1-3. – P. 89-94.
112. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Seventh Edition [Electronic resource]. – 2015 – Available at: <http://www.diabetesatlas.org/>
113. Intra-day variability of cystatin C, creatinine and estimated GFR in intensive care patients / B.Ravn [et al.] // *Clin Chim Acta.* – 2016. – Vol. 460. – P. 1-4.
114. Islam, S. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study / S.Islam, H.Choi // *Pharmacology.* – 2007. – Vol. 79. – P. 243-249.
115. Ismail-Beigi, F. Clinical practice. Glycemic management of type 2 diabetes mellitus / F. Ismail-Beigi // *N Engl J Med.* – 2012. – Vol. 366, № 14. – P. 1319-1327.
116. Janssen, U. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes / U.Janssen, A.O.Phillips, J.Floege // *J Nephrol.* – 1999. – Vol. 12. – P.159-172.

117. Jefferson, J.A. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint / J.A.Jefferson, S.J.Shankland, R.H.Pichler // *Kidney Int.* – 2008. – Vol. 74, № 1. – P. 22-36.
118. Juillerat-Jeanneret, L. Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: therapeutics for type 2 diabetes and what else? / L. Juillerat-Jeanneret // *J Med Chem.* – 2014. – Vol. 57, № 6. – P. 2197-2212.
119. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease / *Kidney inter.* – 2013. – Vol. 3. – P. 1-150.
120. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes / R.S.Danda [et al.] // *Kidney Int.* – 2005. – Vol. 68, № 6. – P. 256-271.
121. Kim, S.S. Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients / S.S.Kim [et al.] // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2012. – Vol. 97, № 2. – P. 251-257.
122. Klachko, D. Use of metformin in patients with kidney and cardiovascular diseases / D.Klachko, A.Whaley-Connell // *Cardiorenal Med.* – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 87-95.
123. Lendeckel, U. Dipeptidyl aminopeptidases. basic science and clinical applications / In: U. Lendeckel, D. Reinhold, U. Bank (eds.) // *Advanced in experimental medicine and biology*, 1st ed. – US: Springer, 2006. – P. 3-38.
124. Levey, A.S. A new equation to estimate glomerular filtration rate / A.S.Levey [et al.] // *Ann Intern Med.* – 2009. – Vol. 150. – P. 604-612.
125. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans / A. Viau [et al.] // *J Clin Invest.* – 2010. – Vol. 120, № 11. – P. 4065-4076.
126. Logan, J. L. Studies on the impact of dietary fat composition on proteinuria in diabetic rats / J.L. Logan // *Diabetes Res Clin Pract.* – 1996. – Vol.33, № 1. – P. 21-29.
127. Low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes / K. Klausen [et al.] // *Circulation.* – 2004. – Vol. 110, № 1. – P. 32-35.
128. MacIsaac, R.J. Markers of and risk factors for the development and progression of

- diabetic kidney disease / R.J.MacIsaac, E.I.Ekinci, G.Jerums // *Am J Kidney Dis.* – 2014. – Vol. 63. – P. S39-S62.
129. Magri, C.J. Albuminuria and glomerular filtration rate in type 2 diabetes mellitus / C.J.Magri, S.Fava // *Minerva Urol Nefrol.* – 2011. – Vol. 63, № 4. – P. 273-280.
130. Mahfouz, M.H. Assessment of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and retinol-binding protein 4 (RBP4) in type 2 diabetic patients with nephropathy / M.H.Mahfouz, A.M.Assiri, M.H.Mukhtar // *Biomark Insights.* – 2016. – Vol. 16, № 11. – P. 31-40.
131. Mamgain, S. Immunomodulatory activity of DPP4 / S.Mamgain, S.Mathur, P.Kothiyal // *J Pharmacol Clin Toxicol.* – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 1006.
132. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes / S.E. Inzucchi [et al.] // *Diabetes Care.* – 2015. – Vol. 38, № 1. – P. 140-149.
133. Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal L cell / A.J. Mulherin [ et al.] // *Endocrinology.* – 2011. – Vol. 152, № 12. – P. 4610-4619.
134. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status / X.Stephenne [et al.] // *Diabetologia.* – 2011. – Vol. 54, № 12. – P. 3101-3110.
135. Metformin ameliorates lipotoxicity-induced mesangial cell apoptosis partly via upregulation of glucagon like peptide-1 receptor (GLP-1R) / D.I. Kim [et al.] // *Arch Biochem Biophys.* – 2015. – Vol. 584. – P. 90-97.
136. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression / A.A.Alhaider [et al.] // *Chem Biol Interact.* – 2011. – Vol. 192, № 3. – P. 233-242.
137. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  in mice / A.Maida [et al.] // *Diabetologia.* – 2011. – Vol. 54, № 2. – P. 339-349.
138. Metformin use in patients with historical contraindications or precautions /

- M.J.Crowley [et al.] // Washington (DC): Department of Veterans Affairs (US). – 2016. [Electronic resource]. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0090399/>
139. Microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes treated with vildagliptin vs. sulfonylurea: a retrospective study using german electronic medical records / W.M.Kolaczynski [et al.] // *Diabetes Ther.* – 2016. – Vol. 7, № 3. – P. 483-496.
140. Molecular markers of tubulointerstitial fibrosis and tubular cell damage in patients with chronic kidney disease [Electronic resource] / S.Nakagawa [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 8. – e0136994. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4552842/>
141. Mulvihill, E.E. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors / E.E.Mulvihill, D.J.Drucker // *Endocr Rev.* – 2014. – Vol. 35, № 6. – P. 992-1019.
142. Nephropathy in type 2 diabetes study group. High cardiovascular risk in patients with type 2 diabetic nephropathy: the predictive role of albuminuria and glomerular filtration rate. The NID-2 Prospective Cohort Study / F.C.Sasso [ et al. ] // *Nephrol Dial Transplant.* – 2012. – Vol. 27, № 6. – P. 2269-2274.
143. Nephroprotective effects of metformin in diabetic nephropathy / S.Ravindran [et al.] // *J Cell Physiol.* – 2017. – Vol. 232, № 4. – P. 731-742.
144. NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease / T.L. Nickolas [et al.] // *Kidney Int.* – 2012. – Vol. 82, № 6. – P. 718-722.
145. Nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetic patients and in the general population (national evaluation of the frequency of renal impairment coexisting with NIDDM [NEFRON] 11) / M.Thomas [et al.] // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32. – P. 1497-1502.
146. Novel biomarkers for early diagnosis and progression of diabetic nephropathy / L.Liu [et al.] // *ARC J Diabetes Endocrinol.* – 2015. – Vol. 1, № 1. – P. 14-30.
147. Novel urinary biomarkers in pre-diabetic nephropathy / V.Garg [et al.] // *J Clin Exp Nephrol.* – 2015. – Vol. 19, № 5. – P. 895–900.

148. One-year safety, tolerability and efficacy of vildagliptin in patients with type 2 diabetes and moderate or severe renal impairment / W.Kothny [et al.] // *Diabetes Obes Metab.* – 2012. – Vol. 14, № 11. – P. 1032-1039.
149. Panchapakesan, U. The role of dipeptidyl peptidase - 4 inhibitors in diabetic kidney disease [Electronic resource] / U.Panchapakesan, C.Pollock // *Front Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 443. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4551869/>
150. Paracchini, V. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review/ V.Paracchini, P.Pedotti, E.Taioli // *Am J Epidemiol.* – 2005. – Vol. 162, № 2. – P. 101-114.
151. Patel, A. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes / A.Patel [et al.] // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 358. – P. 2560-2572.
152. Patients with type 2 diabetes having higher glomerular filtration rate showed rapid renal function decline followed by impaired glomerular filtration rate: Japan Diabetes Complications Study / T.Moriya [ et al.] // *J Diabetes Complications.* – 2017. – Vol. 31, № 2. – P.473-478.
153. Penno, G. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition in chronic kidney disease and potential for protection against diabetes-related renal injury / G.Penno, M.Garofolo, S.Del Prato // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2016. – Vol. 26, № 5. – P. 361-373.
154. Plasma and urinary type IV collagen levels for early detection of nephropathy in type 2 diabetes mellitus patients / K.B.Mahendran [et al.] // *Int J Health Sci (Qassim).* – 2016. – Vol. 10, № 4. – P. 492-498.
155. Rafieian Kopaei, M. Protective effects of metformin on renal tubular cells [Electronic resource] / M.Rafieian Kopaei, A.Baradaran // *Iran Red Crescent Med J.* – 2014. – Vol. 16, № 9. – P. e11662. – Available at: <http://ircmj.com/en/articles/16013.html>
156. Raij, L. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats / L.Raij, S.Azar, W.Keane // *Kidney Int.* – 1984. – Vol. 26, № 2. – P. 137-143.
157. Renal function in the noninsulin-dependent diabetic rat: effects of unilateral

- nephrectomy / S. Mahmood [et al.] // *J Pharmacol Toxicol Methods*. – 1997. – Vol. 37, № 4. – P. 197-203.
158. Renal function in type 2 diabetes with rosiglitazone, metformin, and glyburide monotherapy / J.M.Lachin [et al.] // *Clin J Am Soc Nephrol*. – 2011. – Vol. 6, № 5. – P. 1032-1040.
159. Renal Pathology Society. Pathologic classification of diabetic nephropathy / T.W.Tervaert [et al.] // *J Am Soc Nephrol*. – 2010. – Vol. 21, № 4. – P. 556-563.
160. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin [Electronic resource] / J.Kim [et al.] // *Exp Diabetes Res*. – 2012. – 2012. – P. 210821. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2012/210821/>
161. Renoprotective effect of DPP-4 inhibitors against free fatty acid-bound albumin-induced renal proximal tubular cell injury / Y. Tanaka [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2016. – Vol. 470, № 3. – P. 539-545.
162. Reutens, A.T. Epidemiology of diabetic kidney disease / A.T.Reutens // *Med Clin North Am*. – 2013. – Vol. 97, № 1. – P. 1-18.
163. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study / M.A.Gall [et al.] // *BMJ*. – 1997. – Vol. 314, № 7083. – P. 783-788.
164. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74 / R.Retnakaran [ et al.] // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 1832-1839.
165. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus [Electronic resource] / S.R.Salpeter [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2010. – Vol. 4. –P. CD002967. – Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD002967.pub4/full>
166. Role of nutrient-sensing signals in the pathogenesis of diabetic nephropathy [Electronic resource] / S.Kume [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2014. – 2014. – P. 315494. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4122096/>
167. Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease / K.R. Hallows [et al.] // *Am J Physiol Renal Physiol*. – 2010. – Vol. 298, № 5. – P. 1067-1077.

168. Senior, P.A. Diabetic nephropathy, chronic kidney disease and metabolic syndrome in type 2 diabetes: answers or more questions? / P.A.Senior // *Diabet Med.* – 2008. – Vol. 25, № 12. – P. 1377-1379.
169. Serum cystatin C and tubular urinary enzymes as biomarkers of renal dysfunction in type 2 diabetes mellitus / H.S.Assal [et al.] // *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.* 2013. – Vol. 6. – P. 7-13.
170. Severe hypoglycaemia and cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis with bias analysis [Electronic resource] / A.Goto [et al.] // *BMJ.* – 2013. – Vol. 347. – P. f4533. – Available at: <http://www.bmj.com/content/347/bmj.f4533.long>
171. Solskov, L. Evaluation of the relationship between hyperinsulinaemia and myocardial ischaemia/ reperfusion injury in a rat model of depression / L.Solskov, B.Løfgren, R.Poldetal // *Clinical Science.* – 2010. – Vol. 118, № 4. – P. 259-267.
172. Sowers, K. M. Diabetic nephropathy and tubulointerstitial fibrosis in cardiometabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus / K.M.Sowers, J.Habibi J., M.R.Hayden // *J Cardiometab Syndr.* – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 143-148.
173. Srinivasan, K. Animal models in type 2 diabetes research: an overview / K.Srinivasan, P.Ramarao // *Indian J Med Res.* – 2007. – Vol. 125, № 3. – P. 451-472.
174. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy / M.Dalla Vestra [ et al. ] // *Diabetes Metab.* – 2000. – Vol. 26, S. 4. – P. 8-14.
175. Systematic review and meta-analysis of vildagliptin for treatment of type 2 diabetes / E.Bekiari [et al.] // *Endocrine.* – 2016. – Vol. 52, № 3. – P. 458-480.
176. Szkudelski, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model / T.Szkudelski // *Exp Biol Med (Maywood).* – 2012. – Vol. 237, № 5. – P. 481-490.
177. Tani, S. Association between urinary albumin excretion and low-density lipoprotein heterogeneity following treatment of type 2 diabetes patients with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, vildagliptin: a pilot study / S.Tani, K.Nagao, A.Hirayama // *Am J Cardiovasc Drugs.* – 2013. – Vol. 13, № 6. – P. 443-450.

178. Tesch, G.H. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy / G.H.Tesch, T.J.Allen // *Nephrology (Carlton)*. – 2007. – Vol. 12, № 3. – P. 261-266.
179. The characterization of high-fat diet and multiple low dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model [Electronic resource] / M. Zhang [et al.] // *Exp Diabetes Res*. – 2008. – 2008. – P. 704045. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2008/704045/>
180. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review / M.G.Wulffele [et al.] // *J Int Med*. – 2004. – Vol. 256. – P. 1-14.
181. The impact of severe hypoglycemia on renal impairment in type 2 diabetes / Y.L.Lee [et al. ] // *Diabetes Res Clin Pract*. – 2015. – Vol. 108, № 3. – P. 448-455.
182. Fluctuation between fasting and 2-H postload glucose state is associated with chronic kidney disease in previously diagnosed type 2 diabetes patients with HbA1c  $\geq$  7% [Electronic resource] / C.Wang [ et al. ] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 7. – P. e102941. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4105498/>
183. The short-term effect of a switch from glibenclamide to metformin on blood pressure and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus / N.Amador-Licona [et al.] // *Arch Med Res*. – 2000. – Vol. 31, № 6. – P. 571-575.
184. The US-based Animal Models of Diabetes Complications Consortium [Electronic resource]. – Available at: <http://www.amdcc.org>
185. Thiazolidinediones, metformin, and outcomes in older patients with diabetes and heart failure: an observational study / F.A.Masoudi [et al.] // *Circulation*. – 2005. – Vol. 111, № 5. – P. 583-590.
186. Togashi, Y. Urinary cystatin C as a biomarker for diabetic nephropathy and its immunohistochemical localization in kidney in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats / Y.Togashi, Y.Miyamoto // *Exp Toxicol Pathol*. – 2013. – Vol. 65, № 5. – P. 615-622.



187. Tramonti, G. Tubular biomarkers to assess progression of diabetic nephropathy / G.Tramonti, Y.S.Kanwar // *Kidney Int.* 2011. – Vol. 79, № 10. – P. 1042-1044.
188. Tramonti, G. Tubular biomarkers to assess progression of diabetic nephropathy / G.Tramonti, Y.S.Kanwar // *Kidney Int.* – 2011. – Vol. 79, № 10. – P. 1042-1044.
189. Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin. A possible role of HIF-1 $\alpha$  expression and oxygen metabolism / Y.Takiyama [et al.] // *Diabetes.* – 2011. – Vol. 60, № 3. – P. 981-992.
190. Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients / S.E.Nielsen [et al.] // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2012. – Vol. 97, № 1. – P. 71-76.
191. Tziomalos, K. Diabetic nephropathy: new risk factors and improvements in diagnosis / K.Tziomalos, V.G.Athyros // *Rev Diabet Stud.* – 2015. – Vol. 12, № 1-2. – P. 110-118.
192. United States Renal Data System 2011 annual data report: atlas of chronic kidney disease & end stage renal disease in the United States / A.J.Collins [et al.] // *Am J Kidney Dis.* – 2012. – Vol. 59, Suppl. 1 (A7). – P. e1- 420.
193. Urinary biomarkers in the assessment of early diabetic nephropathy [Electronic resource] / C.Gluhovschi [et al.] // *J Diabetes Res.* – 2016. – 2016. – P. 4626125. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/4626125/>
194. Urinary collagen IV and GST: potential biomarkers for detecting localized kidney injury in diabetes – a pilot study / J.Cawood [et al.] // *Am J Nephrol.* – 2010. – Vol. 32. – P. 219–225.
195. Urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in diabetic rats [Electronic resource] / A.S.Arellano-Buendía [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2014. – 2014. – P. 961326. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/961326/>
196. Urinary excretion of type IV collagen and laminin in the evaluation of nephropathy in NIDDM: comparison with urinary albumin and markers of tubular dysfunction and/or damage / N.Banu [et al.] // *Diabetes Res Clin Pract.* – 1995. – Vol. 29, No. 1. – P. 57-67.

197. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes / J.A.de Carvalho [et al.] // *Clin Biochem.* – 2016. – Vol. 49, № 3. – P. 232-236.
198. Urinary Kim-1 is a sensitive biomarker for the early stage of diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats / K.Hosohata [et al.] // *Diab Vasc Dis Res.* – 2014. – Vol. 11, № 4. – P. 243-250.
199. Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease / A.Kamijo, T.Sugaya, A.Hikawaetal // *Mol Cell Biochem.* – 2006. – Vol. 284, No. 1-2. – P. 175-182.
200. Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin as a marker of tubular damage in type 2 diabetic patients with and without albuminuria / A.AL-Refai [et al.] // *Open J Nephrol.* – 2014. – Vol. 4. – P. 37-46.
201. Urinary TNF- $\alpha$  and NGAL are correlated with the progression of nephropathy inpatients with type2diabetes / J.Wu [et al.] // *Exp Ther Med.* – 2013. – Vol. 6, № 6. – P. 1482-1488.
202. Urinary type IV collagen excretion reflects renal morphological alterations and type IV collagen expression in patients with type 2 diabetes mellitus / H.Okonogi [et al.] // *Clin Nephrol.* – 2001. – Vol. 55, № 5. – P. 357-364.
203. Urinary type IV collagen: a specific indicator of incipient diabetic nephropathy / Y.Tan [et al.] // *Chin Med J (Engl).* – 2002. – Vol. 115, № 3. – P. 389-394.
204. Vallon, V. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney / V.Vallon, S.C.Thomson // *Annu Rev Physiol.* – 2012. – Vol. 74. – P. 351-375.
205. Vallon, V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney / V.Vallon // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2011. – Vol. 300, № 5. – P. R1009-1022.
206. Variability in response to albuminuria-lowering drugs: true or random? / S.I.Petrykiv [et al.] // *Br J Clin Pharmacol.* – 2017. – 83, № 6. – P. 1197-1204.
207. Vildagliptin restores renal myogenic function and attenuates renal sclerosis independently of effects on blood glucose or proteinuria in zucker diabetic fatty rat

- / Vavrinec P [et al.] // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2014. – Vol. 12, № 6. – P. 836-844.
208. Von Eynatten, M. Urinary LFABP and anaemia: distinct roles of urinary markers in type 2 diabetes / M.Von Eynatten, M.Baumann, U.Heemannetal // *Eur J Clin Invest.* – 2010. – Vol.40, № 2. – P. 95-102.
209. Watanabe, M. DPP-4 inhibitor vildagliptin reduces urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria / M.Watanabe, F.Furuya, T.Kobayashi // *Endocrine Abstracts.* – 2012. – Vol. 29. – P. 687.
210. Xue, R. Mechanistic insight and management of diabetic nephropathy: recent progress and future perspective [Electronic resource] / R. Xue [et al.] // *J Diabetes Res.* – 2017. – 2017. – P. 1839809. – Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2017/1839809/>
211. Ziyadeh, F.N. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy / F.N.Ziyadeh, G.Wolf // *Curr Diabetes Rev.* – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 39-45.
212. KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD // *Am J of Kidn Dis.* – 2012. – Vol. 60, № 5. – P. 850-886.
213. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells / T.Ichimura // *J Clin Invest.* – 2008. – Vol. 118, № 5. – P. 1657-1668.
214. Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced renal tubular cell injury by suppressing reactive oxygen species generation via reducing receptor for AGEs (RAGE) expression / Y.Ishibashi [ et al. ] // *Horm Metab Res.* – 2012. – Vol. 44, № 12. – P. 891-895.
215. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes / R.R.Holman [et al.] // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 359, № 15. – P. 1577-1589.