

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЭНДОКРИНОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЗУРАЕВА

ЗАМИРА ТОТРАЗОВНА

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ
НЕФРОПАТИИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА И
ОЦЕНКА НЕФРОПРОТЕКТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ ТЕРАПИИ
ИНКРЕТИНАМИ**

14.01.02 – эндокринология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор,
академик РАН
М.В. Шестакова

Москва – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Актуальность проблемы	10
1.2. Патогенез диабетической нефропатии	11
1.2.1. Биомаркеры гломерулярного поражения	15
1.2.2. Биомаркеры тубулоинтерстициального поражения	20
1.3. Физиологические эффекты агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1	25
1.4. Резюме	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 Дизайн исследования.....	33
2.2. Методы исследования.....	38
2.2.1. Объективное исследование	38
2.2.2. Лабораторно-инструментальное обследование	38
2.2.3. Специальные методы исследования	40
2.3 Статистическая обработка результатов	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
3.1. Одномоментное исследование	43
3.1.1. Клиническая характеристика групп.....	43
3.1.2. Мочевые биомаркеры.....	46
3.1.2. Плазменные биомаркеры	56
3.1.3. Диагностическая значимость исследуемых биомаркеров.....	60
3.2. Проспективное исследование.....	65
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	76
ВЫВОДЫ	77
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	78
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	79
Список сокращений	93

ВВЕДЕНИЕ

Стремительный рост и распространенность сахарного диабета (СД) во всем мире являются причиной больших социально-экономических затрат. По данным Международной Федерации Диабета (IDF) общая численность больных СД в мире за последние 10 лет увеличилась более чем в 2 раза и в 2017 г. составила 425 млн человек [IDF, 2015]. В Российской Федерации число пациентов с СД на начало 2017 г. достигло 4,35 млн. [Дедов ИИ и др., 2017], что также указывает на двукратные темпы прироста за последние годы. Одной из причин ранней инвалидизации и смертности больных с СД являются ассоциированные с ним микрососудистые осложнения со стороны почек (диабетическая нефропатия (ДН)). В структуре смертности пациентов с СД в России терминальная почечная недостаточность (ТПН) вследствие ДН является третьей по частоте причиной смерти у пациентов с СД 1-го типа (7,1%) и седьмой – у пациентов с СД 2-го типа (1,8%). [Дедов ИИ и др., 2017]

Патологическое действие гипергликемии реализуется посредством сложного механизма: помимо влияния на почечную гемодинамику и функцию канальцев, гипергликемия инициирует избыточное образование активных форм кислорода, конечных продуктов гликирования и повышение экспрессии их рецепторов, активацию цитокинов, профиброгенных и ростовых факторов, полиолового и гексозаминового путей, что в конечном итоге приводит к гломерулосклерозу и нарушению функции почек. [Alicic и др., 2017]

Длительное время «альбуминцентрическая» концепция ДН рассматривалась в качестве единственного раннего теста доклинической диагностики ДН, однако в последние годы позиции в отношении чувствительности и специфичности микроальбуминурии (МАУ) в диагностике ранних стадий ДН, особенно при СД 2 типа, значительно пересмотрены.

В настоящее время идентифицирован ряд соединений, определяемых в крови и моче больных СД, в отношении ряда из них установлена

патогенетическая взаимосвязь со специфическими тубулоинтерстициальными и гломерулярными изменениями, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных маркеров ранних диабетических изменений почек. [Шестакова МВ, 2012], [Лебедева НО и др., 2012]

Таблица 1. Предполагаемые биомаркеры диабетической нефропатии.

гломерулярные	тубулоинтерстициальные
Коллаген IV типа	Остеопонтин
Нефрин	Уромодулин (белок Тамма-Хорсфалла)
Подоцин	Молекула почечного повреждения 1-го типа (KIM-1)
Цистатин С	Нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (NGAL)

В свою очередь, доклиническая диагностика почечного повреждения позволит инициировать нефропротективную терапию, когда она наиболее эффективна. До настоящего времени с целью нефропротекции использовались две группы препаратов, воздействующих на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС): блокаторы рецепторов ангиотензина II (БРА) и ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ). Несмотря на активное применение блокаторов РААС, уменьшающих

альбинурию (АУ), пациенты с ДН, по-прежнему, остаются в группе высокого риска прогрессирующего снижения почечной функции, что обуславливает необходимость поиска дополнительных путей нефропротекции.

В диабетологической практике получил широкое распространение новый класс сахароснижающих препаратов (ССП) – агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (а-рГПП-1), которые, помимо высокой сахароснижающей активности с низким риском гипогликемий, обладают плеiotропными органопротективными эффектами, в том числе на функцию почек. [Baggio и др., 2007]

Таким образом, разработка дополнительных высокоинформативных тестов ранней (до развития МАУ) диагностики ДН, позволяющих стратифицировать пациентов в группы высокого риска развития и прогрессирования ДН, а также внедрение новых эффективных нефропротективных препаратов, являются одними из приоритетных направлений здравоохранения.

Цель исследования:

Определить информативность использования биомаркеров гломерулярного и тубулоинтерстициального поражения почек в ранней диагностике ДН и оценке нефропротективных эффектов сахароснижающей терапии а-рГПП-1 у пациентов с СД 1 типа на доальбинурической стадии.

Задачи исследования:

1. Определить содержание исследуемых гломерулярных и тубулоинтерстициальных биомаркеров в крови и моче пациентов с СД 1 типа на различных стадиях ДН и их корреляцию с клиническими и метаболическими факторами риска ДН (гликированный гемоглобин, АД) и классическими маркерами поражения почек (АУ, СКФ).

2. Оценить диагностическую значимость исследуемых биомаркеров на основании сопоставления чувствительности и специфичности методики по сравнению с оценкой АУ.

3. Определить диагностическую панель биомаркеров доклинического повреждения почек при СД 1 и рассчитать пороговый диагностический уровень для биомаркеров с максимальными показателями чувствительности и специфичности.

4. Изучить влияние терапии а-рГПП-1 (лираглутид) на динамику биомаркеров гломерулярного и тубулоинтерстициального поражения почек при добавлении к инсулинотерапии на доклинической стадии повреждения почек.

Научная новизна.

В данной научно-исследовательской работе впервые будет оценена информативность использования неинвазивных биомаркеров гломерулярного и тубулоинтерстициального поражения почек с целью ранней (до развития МАУ) диагностики ДН. Также впервые будут изучены нефропротективные свойства терапии а-рГПП-1 у больных СД 1 типа на основании оценки динамики стандартных клинических и исследуемых биомаркеров поражения почек.

Практическая значимость.

Идентификация ранних и высокоспецифичных биомаркеров ДН позволит использовать их в доклинической диагностике диабетического поражения почек, а также выделять пациентов группы высокого риска, нуждающихся в наиболее ранней превентивной терапии. В свою очередь, доказательство полученных в эксперименте нефропротективных свойств а-рГПП-1 у пациентов СД 1 типа, возможно, откроет новые перспективы нефропротекции сахароснижающей терапии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изменение уровня гломерулярных и тубулоинтерстициальных биомаркеров у пациентов с СД 1 по сравнению со здоровым контролем выявляются до развития МАУ: повышение мочевого экскреции нефрина, подоцина, коллагена IV типа, цистатина С, снижение мочевого экскреции уромодулина, повышение в плазме крови уровня остеопонтинина и цистатина С. Изменение содержания указанных биомаркеров коррелирует со степенью выраженности ДН, определенной стандартными диагностическими тестами – АУ и СКФ.

2. Определение нефрина и подоцина в моче, цистатина С и остеопонтинина в плазме обладает большей чувствительностью и специфичностью по сравнению со стандартным исследованием МАУ, что указывает на их более высокую диагностическую значимость и позволяет рассматривать в качестве диагностической панели для раннего выявления ДН.

3. Установлены пороговые диагностические значения панели биомаркеров для доклинической диагностики ДН при СД 1 типа: нефрин > 0,006 нг/ммоль, подоцин > 0,009 нг/ммоль мочи, цистатин С > 0,8 мг/л, остеопонтин > 64,4 нг/мл плазмы.

4. Добавление к инсулинотерапии а-рГПП-1 (1,2 мг/сут.) в течение 6 месяцев приводит к снижению уровня экскреции ранних биомаркеров ДН в моче (нефрин, подоцин) и плазме крови (остеопонтин, цистатин С), что свидетельствует о наличии дополнительного нефропротективного эффекта у данного препарата.

Апробация работы и публикации.

Работа выполнена на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) с использованием клинического материала отделения диабетической болезни почек и посттрансплантационной реабилитации Института диабета ФГБУ «НМИЦ

эндокринологии» (директор – академик РАН Шестакова М.В. Аprobация диссертации состоялась на совместном заседании сотрудников кафедры эндокринологии лечебного факультета ФGAOУ BO Первый MГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и научных сотрудников ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России 06 июля 2018 года.

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 входят в перечень отечественных рецензируемых журналов, рекомендуемых для публикации основных результатов исследований. Основные положения диссертации были представлены на национальных и международных специализированных медицинских конференциях и конгрессах.

1. Клинический потенциал использования протеомного анализа в ранней диагностике хронической болезни почек у больных сахарным диабетом. VII Всероссийский диабетологический конгресс «Сахарный диабет в XXI веке - время объединения усилий" (Москва 2015 г.)
2. Биомаркеры хронической болезни почек у больных сахарным диабетом 1 типа. VII Всероссийский конгресс эндокринологов. Достижения персонализированной медицины сегодня - результат практического здравоохранения завтра (Москва 2016 г.)
3. Novel biomarkers of chronic kidney disease in diabetes. 18-й Конгресс Европейской ассоциации эндокринологов (ESE, Мюнхен 2016 г.)
4. Early biomarkers of chronic kidney disease in diabetic patients. 5-й Европейский конгресс по атеросклерозу (EAS, Инсбрук 2016 г.)
5. Predictive Biomarkers for Chronic Kidney Disease in Diabetes. 52-й Конгресс Европейской ассоциации по изучению диабета (EASD, Мюнхен 2016 г.).

6. Tubular and glomerular biomarkers of kidney injury on glucagon-like peptide-1 (glp-1) therapy in type 1 diabetic patients. 19-й Конгресс Европейской ассоциации эндокринологов (Мюнхен 2017).
7. Экскреция с мочой маркеров повреждения подоцитов у больных сахарным диабетом. Терапевтический архив, 2015.
8. Негликемические эффекты инкретинов у пациентов с длительным течением сахарного диабета 1-го типа и хронической болезнью почек. Терапевтический архив, 2015.
9. Ренальные эффекты агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида у больных сахарным диабетом 1-го типа. Терапевтический архив, 2018.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 94 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиография включает 134 источников литературы (из них 5 отечественные и 129 зарубежные). Работа иллюстрирована 6 таблицами и 32 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальность проблемы.

ДН занимает лидирующие позиции в структуре больных с ТПН, требующих проведения экстракорпоральных методов лечения (программный гемодиализ, трансплантация почки), представляя собой одну из наиболее затратных областей здравоохранения во всем мире. В условиях хронической гипергликемии запускается каскад патологических реакций, приводящих к последовательному развитию диабетических изменений от развития гиперфльтрации до формирования диффузного и нодулярного гломерулосклероза, характеризующегося прогрессирующим снижением фильтрационной функции почек, протеинурии, азотемии и в конечном итоге развитием ТПН.

В 1960–х годах разработка метода определения МАУ, в том числе при СД, стала революцией в диагностике поражения почек. [Wolf и др., 2007] В 2002 г. Национальный почечный Фонд США предложил дефиницию и классификацию ХБП, основанную на определении маркеров почечного повреждения (МАУ) и оценке скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по сывороточной концентрации креатинина [National Kidney Foundation, 2002] Эта классификация позволила унифицировать и стандартизировать понятие ХБП, определяя развитие и прогрессирование почечного повреждения независимо от этиологии поражения. МАУ (ХБП стадия альбуминурии А2 в соответствии с рекомендациями KDIGO) была признана предиктором прогрессирования ДН до стадии ТПН у пациентов с СД 1 [Mogensen, 1987] и СД 2 типа [Adler и др., 2003][Afghahi и др., 2011] В настоящее время, сниженная СКФ и повышенная АУ рассматриваются главными индикаторами клинического исхода ДН. Однако, в исследовании UKPDS было продемонстрировано, что у 51 % пациентов с СД, достигших хронической почечной недостаточности (ХПН), не было выявлено предшествующей МАУ.

Проспективные исследования показали, что значительная доля пациентов с МАУ вновь регрессировала до нормоальбуминурии (НАУ), у одной трети пациентов ДН манифестировала на стадии протеинурии (ПУ), и лишь 30 % пациентов с МАУ прогрессировала до стадии ПУ [Caramori, Fioretto, Mauer, 2006], [Perkins и др., 2003]

Таким образом, полиэтиологический характер и высокая вариабельность МАУ обуславливают низкую чувствительность и специфичность метода в качестве предиктора развития ДН, что определяет необходимость поиска дополнительных высокочувствительных тестов ранней диагностики ДН.

1.2. Патогенез диабетической нефропатии.

Развитие и прогрессирование диабетических изменений в почках является следствием совокупного воздействия ряда гемодинамических, метаболических и генетических факторов. В настоящее время гипергликемии отводится ведущая роль в развитии микро- и макрососудистых осложнений СД. Одним из крупных исследований, подтвердивших возможность предотвращения развития ДН у хорошо компенсированных пациентов с СД 1 типа стало исследование DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), указывавшее на важную роль метаболических изменений в развитии патологии почек [Nathan и др., 1993] Важная роль оптимального контроля гликемии в патогенезе диабетических осложнений подтверждается и тем фактом, что уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) является независимым фактором риска смерти от сердечнососудистых событий, а гипергликемия признана фактором риска макрососудистых осложнений при СД 1 типа [Kilpatrick, 2012], [Mogensen, 1997], [Nathan, 2014] С другой стороны, данные эпидемиологических и проспективных исследований показали, что повреждение сосудистой системы продолжается даже после компенсации углеводного обмена, т.е. неудовлетворительный контроль гликемии в дебюте заболевания «программирует» организм на развитие и

прогрессирование микро- и макрососудистых осложнений несмотря на хороший комплаенс пациента в последующие годы, формируется так называемый феномен «метаболической памяти». Персистенция патологических эффектов гипергликемии представляется возможной благодаря запуску процессов оксидативного стресса, накоплению конечных продуктов гликозилирования, а также эпигенетическим изменениям. [Nathan, 2014]

Исследования на культуре эпителиальных клеток показали важную роль в развитии и прогрессировании ДН следующих механизмов:

- Центральная роль активных форм кислорода (АФК), образующихся в ходе метаболизма в мезангиальных клетках.
- Гиперпродукция митохондриального супероксида под действием гипергликемии, приводящего к дисбалансу клеточных редуктаз и активации оксидативного стресса.
- Повреждение антиоксидантных систем организма в условиях повышенной концентрации глюкозы, сопровождающееся снижением уровня митохондриальной марганец-зависимой супероксиддисмутазы (MnSOD) и повреждение митохондриальной ДНК, приводящие к накоплению АФК [Al-Kafaji и др., 2013].
- Накопление конечных продуктов гликирования. Большинство этих продуктов подвергается почечной элиминации, однако некоторые из них, например, коллаген, имеют длительный период жизни и продолжают подвергаться конечному гликозилированию. Кроме того, рецепторы продуктов гликозилирования такие как RAGE, располагающиеся в почках, играют важную роль в потенцировании патологических эффектов, повышая экспрессию TGF β и других цитокинов, опосредующих трансдифференцировку эпителиальных клеток в миофибробласты, - пусковой механизм в формировании тубулоинтерстициального фиброза. [Oldfield и др.,

2001]

- Активация внутриклеточных сигнальных молекул, таких как протеинкиназа C, играющих важную роль в гиперплазии базальной мембраны клубочков (БМК) и сигнальной трансдукции ростовых факторов. [Thallas-Bonke, Cooper, 2013]

- Вялотекущее воспаление, приводящее к активации цитокинов (TGF β), профиброгенных факторов и сосудистых ростовых факторов (фактор роста эндотелия сосудов, VEGF) - промоутеров матричной аккумуляции коллагена. [Saraheimo и др., 2003]

- Снижение экспрессии нефрина (трансмембранного протеина, локализованного в щелевой мембране между смежными подоцитами), приводящее к повреждению почечного фильтра и развитию АУ [Jefferson, Shankland, Pichler, 2008]

Клинические наблюдательные исследования преимущественно на пациентах с СД 1 типа позволили определить, что первые несколько лет с момента манифестации СД длится латентный период, характеризующийся нефромегалией, гиперперфузией и гиперфилтрацией в почках, не имеющих клинических проявлений. (Hostetter TH: Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 2003; 23: 194– 199.) Увеличение плазмотока в клубочках и повышение транскапиллярного гидростатического давления способствует гиперпродукции мезангиального матрикса и повреждению подоцитарного аппарата, утолщению базальной мембраны клубочков и канальцев, проникновению альбумина из просвета капилляров в пространство Боумана, с последующим формированием диффузного и нодулярного гломерулосклероза (Hostetter TH: Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 2003; 23: 194– 199).

Изучение патогенеза ДН позволило идентифицировать ряд биомаркеров гломерулярного и тубулоинтерстициального повреждения, которые

рассматриваются в качестве индикаторов начального диабетического поражения почек, когда все традиционные диагностические показатели функции почек (АУ, СКФ) остаются в норме.

1.2.1. БИОМАРКЕРЫ ГЛОМЕРУЛЯРНОЙ ДИСФУНКЦИИ.

Поражение клубочкового аппарата, сопровождающееся его повышенной проницаемостью, нарушение процессов матричного синтеза и деградации (преимущественно коллагена IV типа и фибронектина), приводит к увеличенной экскреции ряда плазменных и матричных белков, которые могут рассматриваться в качестве индикаторов раннего повреждения почек. Утолщение БМК является первым структурным изменением, который можно оценить уже через 1,5 - 2,5 года после манифестации заболевания. [Wolf, Ziyadeh, 2007]

Коллаген IV типа.

Коллаген IV типа является основным компонентом мезангиального матрикса, а также базальной мембраны клубочков и канальцев, обеспечивая структурную и функциональную поддержку различным типам клеток. Ввиду высокой молекулярной массы (540 кДа) фильтрация этого белка в клубочках минимальна, таким образом экскреция коллагена с мочой может отражать процессы изменения матричного синтеза/деградации в пораженных почках. [Iijima и др., 1998], [Vanu и др., 1995] [Kado и др., 1996] Показано, что при СД нарушается баланс между основными компонентами БМК в виде повышенного отложения коллагена и снижения содержания ламинина и протеогликанов гепаран-сульфата. Повышенное образование коллагена является центральным звеном в поражении экстрацеллюлярного матрикса клубочков. В ряде исследований было показано повышение как сывороточной, так и мочевой концентрации коллагена IV при СД 2 типа, которая коррелировала с уровнем экскреции альбумина, длительностью диабета, показателями АД и сывороточной концентрацией креатинина [Kado и др., 1996]. Кроме того, значительное повышение уровня экскреции коллагена было выявлено уже на стадии НАУ, а также у пациентов с

нарушенной толерантностью к глюкозе. [Iijima и др., 1998] [Cohen, Lautenslager, Shearman, 2001]

Роль подоцитопатии в развитии ДН.

«Мезангиоцентрическая» концепция ДН длительное время рассматривалась в качестве основного патогенетического механизма развития диабетической патологии почек. Однако результаты гистоморфометрических исследований последних лет показали схожие механизмы повреждения подоцитарного аппарата - стирание ножек подоцитов, уменьшение их количества и/или плотности, дедифференцировка уже на самых ранних стадиях развития ДН при обоих типах СД. [Torbjrnsson и др., 2005] , [Steffes и др., 2001], [White и др., 2001].

Подоциты представляют собой не способные к регенерации высокоспециализированные висцеральные эпителиальные клетки, формирующие актиновый цитоскелет и регулирующие селективность и проницаемость щелевой диафрагмы клубочков. Подоцитопения инициирует процессы гломерулосклероза, усиливая формирование синехий между подоцитами и БМК. Повреждение целостности подоцитарного цитоскелета сопровождается сплющиванием, расширением и сокращением подоцитов, развитием т.н. феномена «стирания» ножек подоцитов, что приводит к развитию протеинурии [Mundel, 2002], [Asanuma, Mundel, 2003], и др., 2009]. Закономерен интерес к экскреции различных подоцит-специфичных белков, позволяющих оценить наличие диабетических изменений в почках на самых ранних стадиях заболевания [Бобкова, Шестакова, Щукина, 2014].

Нефрин и подоцин относятся к белкам, ассоциированным с щелевой диафрагмой клубочков. Нефрин относится к суперсемейству иммуноглобулинов (IgCAM), внеклеточные домены которого формируют «скелет» щелевой диафрагмы, а внутриклеточный домен, содержащий 8

тирозиновых остатков, реализует действие нефрина как сигнальной адгезивной молекулы [Huber и др., 2003]. Подоцин имеет молекулярную массу 42 кДа и относится к белкам стоматинового семейства, локализуясь в ножках подоцитов, он взаимодействует с нефрином и CD2- ассоциированным протеином (CD2AP), участвуя в образовании трансмембранного комплекса, закрепляя нефрин в гломерулярной мембране. Повреждение или мутации в генах, кодирующих эти белки, могут приводить к массивной протеинурии [Kestilä и др., 1998]. Одним из возможных механизмов участия нефрина в патогенезе ДН является связывание белков, таких как фосфоинозитид-3-киназа и фосфолипаза C γ 1 с цитозольной тирозинфосфорилированной частью [Simons и др., 2001], [Zhu и др., 2008], [Li, 2004], [Verma и др., 2006], что позволяет поддерживать цитоскелет подоцитарного аппарата. У пациентов с ДН экспрессия нефрина и содержание мРНК снижены, что сопровождается повреждением актинового цитоскелета, стиранием ножек подоцитов и разрушением щелевой диафрагмы [Doublier и др., 2003]. Вторым возможным механизмом, это участие нефрина в регуляции чувствительности к инсулину подоцитов. Цитоплазматический домен ответственен за связывание инсулиновых рецепторов GLUT1 и GLUT4 с мембранными белками связанными с везикулами (VAMP), что позволяет распознавать инсулин и реализовать (активировать) внутриклеточные сигнальные пути [Coward и др., 2007]. Так, в условиях нормогликемии удаление подоцит-специфичного рецептора инсулина у мышей приводило к развитию альбуминурии и гистопатологических изменений типичных для ДН [Doublier и др., 2003], [Welsh и др., 2010]. Кроме того, в снижении активности (поражении) нефрина играют важную роль AT II и VEGF [Veron и др., 2010], [Doublier и др., 2003]. В исследованиях \times на животных применение ирбесартана (антагониста AT II рецепторов 1 типа) приводило к нормализации уровня нефрина и снижению альбуминурии [Verma и др., 2006], [Huber и др., 2003].

По данным некоторых гистоморфометрических исследований, значительное расширение подоцитарного пространства, выявляется не только у пациентов с выраженным повреждением ДН на стадии ПУ, но также определяется и на стадии МАУ. По данным исследования почечных биоптатов, выполненное в исследовании ESPRIT (European Study for the Prevention of Renal Disease in Type 1 Diabetes), с повышенной экскрецией альбумина и нормотензией, не было выявлено значительного снижения плотности и количества подоцитов по сравнению с недиабетической группой.

В исследовании Patari et al нефринурия была выявлена у больных СД 1 типа в отсутствие МАУ [Patari и др., 2003], в то время как в исследовании Nakamura повышенная экскреция подоцитов была выявлена только у пациентов с микро- и макроальбуминурией [Nephrology Dialysis Transplantation Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy, 2000].

В свою очередь, повреждение 20 % подоцитарного аппарата сопровождается развитием гломерулосклероза даже в случае, если триггер был устранен.

Цистатин С.

Цистатин С - низкомолекулярный протеин, ингибитор цистеиновых протеаз, секретируемый всеми ядерными клетками. [Abrahamson и др., 1990] Низкий молекулярный вес и положительный заряд при физиологическом pH способствуют свободной фильтрации протеина через клубочковый фильтр, после фильтрации протеин полностью реабсорбируется и катаболизируется клетками проксимальных канальцев. Цистатин С рассматривается в качестве «идеального» эндогенного биомаркера фильтрационной функции почек, в 2004 году был принят FDA в качестве альтернативного метода расчета СКФ. [Coll и др., 2000]. В ряде экспериментальных исследований уровень цистатина С определялся повышенным на самых ранних стадиях ДН и далее увеличивался по мере утяжеления почечного поражения. [Remaratne, 2008]

1.2.2. БИОМАРКЕРЫ ТУБУЛОИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ.

В традиционном представлении формирование характерных структурных изменений в почках при СД 1 типа уникально, типичные морфологические изменения затрагивают преимущественно клубочковый аппарат с утолщением базальной мембраны и развитием мезангиальной экспансии, в то время как специфические изменения канальцевого аппарата, а также интерстиция и артериол появляются уже на более поздних стадиях заболевания. [Fioretto, Steffes, Mauer, 1994], [Brito и др., 1998], [Lane и др., 1993], [Harris и др., 1992]. Однако исследования последних лет показали вовлеченность в патологический процесс и других структурных компонентов ткани почек, а именно: канальцев и интерстиция [Thomas, Burns, Cooper, 2005].

Диабетическая тубулопатия характеризуется рядом структурных и функциональных изменений: гипертрофия тубулоэпителиальных клеток, утолщение базальной мембраны канальцев, эпителиально-мезенхимальная трансформация и накопление гликогена. Развитие указанных изменений в канальцевом аппарате может предшествовать либо протекать параллельно с изменениями в клубочках и на доклинической стадии ДН, когда все лабораторные показатели функции почек остаются в норме, и в виду высоких резервных возможностей маскируют снижение функции почек. [Gilbert, Cooper, 1999].

Биомаркеры канальцевой дисфункции представляют собой энзимы мочи (энзимурия) или плазмы с низким молекулярным весом. Повышение мочевого экскреции этих белков может происходить вследствие сниженной реабсорбции из плазмы или повышенной секреции эпителиальными клетками канальцев, что приводит к развитию ПУ [Barratt, Topham, 2007]. Наиболее изучены среди них липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL) и молекула почечного повреждения 1 типа (KIM-1), которые в

настоящее время рассматриваются в качестве предикторов острого почечного повреждения при различных токсических нефропатиях, ишемическом поражении почек при обширных кардиохирургических вмешательствах или сепсисе [Nauta и др., 2011], [Lacquaniti и др., 2013]. Роль этих биомаркеров в развитии хронической патологии почек пока не изучена.

Липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов.

NGAL является белком с молекулярной массой 25 кДа, ковалентно связанным с желатиназой нейтрофилов и относящийся к семейству липокалинов. В небольших количествах этот белок секретируется клетками легких, почек, трахеи, желудка и кишечника [Bolognani и др., 2008]. В настоящее время NGAL рассматривается в качестве чувствительного и специфичного маркера острого почечного повреждения [Ricci, Ronco, 2009]. По данным исследований выявлена взаимосвязь уровня NGAL с тяжестью повреждения почек при хронических аутоиммунных процессах [Mitsnefes и др., 2007], [Suzuki и др., 2008], различных гломерулопатиях, аутосомно-доминантном поликистозе почек.

У пациентов с СД 1 типа было показано повышение мочевого концентрации NGAL уже на стадии НАУ [Nielsen и др., 2010], а у пациентов с СД 2 типа поражение канальцев развивалось в ранние сроки от начала заболевания; а повышенная концентрация NGAL в моче являлась не только предиктором раннего поражения почек [Fu и др., 2012], но также ассоциировалась с прогрессирующим снижением СКФ на стадии макроальбуминурии и протеинурии [Nielsen и др., 2012]. Таким образом NGAL может стать многообещающим биомаркером как острого, так и хронического поражения почек.

Молекула почечного повреждения 1 типа.

Молекула почечного повреждения 1 типа (KIM-1, HAVCR-1 – клеточный рецептор-1 вируса гепатита А; T клеточный иммуноглобулин-

муцин человека – 1, ТМ-1) является трансмембранным гликопротеином апикальной мембраны клеток проксимальных канальцев почек, гиперэкспрессируемым в ответ на их повреждение. Эктодомен КИМ-1 (приблизительно 90 кДа) расщепляется матричными металлопротеиназами и высвобождается в мочу [Ichimura и др., 1998], [Bailly и др., 2002], [Zhang, Humphreys, Bonventre, 2007], [Gandhi и др., 2014]. С момента своего открытия он рассматривается в качестве чувствительного и специфического биомаркера почечного повреждения как у животных, так и у людей [Sabbisetti и др., 2014], [Vaidya и др., 2011]. Повышение концентрации КИМ-1 в ответ на повреждение может происходить не только в моче, но также и в циркуляции [Sabbisetti и др., 2014]. Было показано, что повышение плазменной концентрации биомаркера независимо от уровня альбуминурии является предиктором развития ТХПН у пациентов с СД 1 типа и протеинурией. [Sabbisetti и др., 2014]

Уромодулин (белок Тамм-Хорсфалла).

Уромодулин продуцируется преимущественно в тонкой восходящей части петли Генле, практически не фильтруется в клубочках, в связи с чем основная часть этого белка имеет почечное происхождение. [Serafini-Cessi, Malagolini, Cavallone, 2003]

В настоящее время окончательная роль уромодулина в патогенезе повреждения почек еще не выяснена. Имеются данные об участии протеина в солевом обмене [Torffvita, Melanderb, Hulténb, 2004], регуляции внутриклубочковой гемодинамики, а также защите от мочевых инфекций, вызванных преимущественно уропатогенными штаммами *E. Colli*. [Pak и др., 2001] Уромодулин рассматривается в качестве перспективного маркера количества интактных клеток канальцев, отражая реальную почечную массу в большей степени, чем клубочковая фильтрация. Сниженная мочевая и сывороточная концентрация уромодулина была выявлена у пациентов с

интерстициальным фиброзом, тубулярной атрофией [Prajczer и др., 2010].. В 20-летнем наблюдательном исследовании сниженная концентрация уромодулина в моче больных СД 1 типа ассоциировалась с развитием терминальной стадии почечной недостаточности и смертностью от сердечно-сосудистых событий. [Sejdiu, Torffvit, 2008] Кроме того было показано, что у 20 % больных СД 1 типа отмечается персистирующее снижение уровня уромодулина в течение первых лет после манифестации заболевания. [Holmquist и др., 2001]

Остеопонтин.

Остеопонтин является кальций-связывающим фосфогликопротеином экспрессируемым остеобластами, макрофагами, различными эпителиальными клетками, в здоровых почках экспрессируется в петле Генле и дистальных канальцах [Xie и др., 2001]. Также как и ряд других цитокиновых систем (TGF β , ангиотензин II), остеопонтин играет важную роль в процессах тубулоинтерстициального поражения почек, обеспечивая процессы клеточной адгезии и миграции, ускоряя процессы ремоделирования актинового цитоскелета в подоцитах, индуцированных механическим растяжением [Denhardt и др., 2001]. Результаты ряда экспериментальных работ продемонстрировали значимое повышение экспрессии остеопонтина в условиях гипергликемии в фибробластах, гладкомышечных и мезангиальных клетках, указывая на непосредственное участие этого гликопротеина в патогенезе диабетического поражения почек. [Wolak и др., 2009], [Nicholas и др., 2010], [Nagaо и др., 2012] На модели мышей с стрептозотоцинининдуцированным СД было выявлено значимое повышение экспрессии остеопонтина в клетках проксимальных канальцев, коррелировавшее с тяжестью интерстициального фиброза, макрофагальной инфильтрацией, аккумуляцией фибробластами, экспрессией генов, ассоциированных с фиброзом и окислительным стрессом [Thouр и др., 2000],

а у мышей нокаутированных по гену остеопонтинина было отмечено уменьшение мезангиальной экспансии и экскреции альбумина. В клинических исследованиях у больных СД 2 типа было показано достоверное повышение плазменной концентрации остеопонтинина в сравнении с группой здорового контроля, коррелировавшее с тяжестью ДН (уровень креатинина и СКФ). [Yan и др., 2010] Иммуногистохимическое исследование почечных биоптатов больных СД выявило выраженное повышение количества остеопонтин-позитивных клеток в проксимальных канальцах почек, коррелировавшее с тяжестью кортикального склероза [Junaid, Amara, 2004].

1.3. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА-1.

В настоящее время интервенционные мероприятия, направленные на торможение развития и прогрессирования ДН, включают в себя воздействие на основные модифицируемые клинические факторы риска, а именно: оптимизация показателей АД, интенсивный гликемический контроль, снижение экскреции альбумина, элиминация курения. Такой многофакторный подход может значительно улучшить клинический исход, как было показано в исследовании Steno-2 [Lund-andersen, Parving, Pedersen, 2008]. В течение последней декады лет препаратами первой линии в лечении ДН являлись иАПФ и БРА, эффективность которых была подтверждена в ряде клинических исследований [Mathiesen и др., 1991], [Reid и др., 1993], [Viberti и др., 1994], [Laffel и др., 1995]. Однако, несмотря на интенсивное воздействие на классические факторы риска и активное применение блокаторов РААС, пациенты с СД по-прежнему остаются в группе высокого риска развития и прогрессирования ДН. Многофакторный генез ДН расширяет спектр поиска потенциальных нефропротективных агентов, позволяющих блокировать различные механизмы их повреждения, в том числе среди инновационных классов сахароснижающих препаратов (ССП).

Агонисты глюкагоноподобного пептида 1-го типа (а-ргППП-1) являются новым классом СПП, обладающих высокой сахароснижающей активностью с низким риском гипогликемий и дополнительным благоприятным эффектом в отношении снижения массы тела. Наряду с этим в последнее время широко обсуждаются плеiotропные эффекты а-ргППП-1, в том числе нейро-, васкуло- и нефропротективные. [Seufert, Gallwitz, 2014], [Websky, Reichetzeder, Hoher, 2014]

В исследованиях *in vitro* было показано, что лираглутид является селективным, мощным и полным агонистом клонированных человеческих

ГПП-1 рецепторов. Биологические эффекты α -рГПП-1 опосредованы связыванием гормона со специфическим ГПП-1 рецептором, который относится к семиспиральному рецептору серпентину, сопряженному с G-белком с молекулярной массой 62 - 65 кДа. [Lankat-buttgereit, Stockmann, 1994], [Cole, 1988] Образование комплекса гормон - рецептор приводит к активации вторичного внутриклеточного мессенджера цАМФ, первичного эффектора ГПП – 1 - индуцированной секреции инсулина [Signal, Holz], активации протеинкиназы А (ПКА), цАМФ- регулируемого гуанин - нуклеотид освобождающего фактора 2 (G_s) и цАМФ/фосфатидилинозитол-3-киназы/ПКС, ингибирующих синтез НАДФН-оксидазы в фагоцитах. Регуляция пищевого поведения, торможение опорожнения желудочно-кишечного тракта, потенциальное кардио- и ренопротективное действие, влияние на костный обмен, далеко не полный и до конца неизученный перечень системных эффектов инкретинов, обусловленный экспрессией инкретиновых рецепторов в различных органах и тканях. [Campbell, 2011]

Иммуногистохимический анализ с использованием моноклональных антител показал наличие рГПП-1 в проксимальных канальцах почек и гладкомышечных клетках артерий и артериол, в т.ч. в ренин-секретирующих клетках юкстагломерулярного аппарата почек (ЮГА). [Schlatter и др., 2007] Стимуляция рГПП-1 в почках может приводить к ингибированию ренальной НАД(Ф)Н – оксидазы, которая рассматривается в качестве основного источника образования АФК в клетках эпителия канальцев и мезангия, опосредуя гипертрофию клубочков и синтез компонентов мезангиального матрикса. [Gorin и др., 2005].

В настоящее время диабетология располагает результатами ряда преклинических и клинических исследований, посвященных изучению влияния инкретинов на функцию почек при СД.

Первой экспериментальной работой, доказавшей улучшение течения ДН на фоне терапии α -рГПП-1 стала работа Park CW и его коллег на модели

db/db крыс с инсулинорезистентностью. [Park и др., 2007]. Как известно, одним из характерных гистологических изменений при ДН является аккумуляция белков экстрацеллюлярного матрикса в мезангии клубочков [Qian и др., 2008], обусловленная повышенной экспрессией трансформирующего фактора роста TGF- β 1 в ткани почек, главного профиброгенного агента, индуцирующего синтез коллагена, повышенную экспрессию VEGF, приводящего к формированию интерстициального и гломерулярного фиброза. [Sharma, Ziyadeh, Control,], [Park и др., 1997] Введение db/db крысам эксендина-4 из расчета 1 нмоль/кг в течение 8 недель приводило не только к улучшению интраперитонеального содержания глюкозы ($p < 0.05$), но также к дозозависимому снижению экскреции альбумина по сравнению с контрольной группой ($p < 0.005$). Более того, были отмечены меньшая воспалительная инфильтрация и повышение активности рецептора PPAR α , увеличение количества рГПП-1 –позитивных клеток, а также значительное снижение суточной экскреции в моче маркёров окислительного повреждения ДНК и оксидативного стресса 8-ОН-dG у генетической модели СД 2 типа db/db и контрольной группы db/m. Повышение экспрессии PPAR ассоциировалось с уменьшением мезангиальной экспансии, синтеза коллагена IV типа, а также ингибированием H₂O₂-опосредованной активации TGF-1. Увеличение числа рГПП-1-позитивных клеток как у мышей с СД 2 типа, так и в группе контроля имело дозозависимый характер. [Park и др., 2007]

Идентичные результаты были получены в экспериментальной работе по введению эксендина -4 в культуру мезангиальных человеческих клеток, приводившего к снижению экспрессии мРНК TGF- β 1 и соединительнотканного фактора роста CTGF. [Li и др., 2012]

В работе Fujita и соавт. методом полимеразной цепной реакции *in situ* гибридизации в режиме реального времени были обнаружены транскрипты мРНК рГПП-1 в стенках капилляров клубочков и других сосудистых стенках у мышей. Для оценки роли рГПП-1 в развитии ДН была создана

экспериментальная линия ДН-резистентных мышей C57BL/6-Akita с нокаутированным геном рГПП-1. [Fujita и др., 2014] Уменьшение базального количества цАМФ и снижение активности ПКА приводило к повышению активности в почках НАД(Ф)Н-оксидазы, избыточному образованию АФК, повышению экспрессии профиброгенных цитокинов НАД(Ф)Н-оксидазы, и, как следствие, к развитию манифестной ДН у ДН-резистентных мышей с классическими морфологическими изменениями в почках в виде увеличения мезангиальной экспансии, подоцитарной дисфункции, утолщения БМК. Полученные данные позволили авторам предположить, что уменьшение количества рГПП-1-позитивных клеток в почках уменьшает защитную антиоксидативную активность в условиях гипергликемии. В том же исследовании на линии гибридных мышей КК/Та-Akita с высокой предрасположенностью к развитию ДН было показано, что развитие тяжелой АУ и мезангиальной экспансии было обусловлено активацией оксидативного стресса в почках. Введение мышам лираглутида в дозе 200 мг/кг ежедневно приводило к повышению уровня цАМФ и ПКА, уменьшению образования NOX4 и снижению активности НАД(Ф)Н-оксидазы в почках, что сопровождалось регрессом альбуминурии, мезангиальной экспансии, клубочковой гипертрофии, улучшением СКФ. Последующее введение животным ингибитора аденилатциклазы SQ22536 и H89 селективного ингибитора ПКА приводило к нивелированию клинических и морфологических эффектов лираглутида, подтверждая гипотезу о наличии у а-рГПП-1 антиоксидантного и протективного действия.

В экспериментальной работе Mima и соавт. был обнаружен еще один биохимический механизм противовоспалительного действия а-рГПП-1, обусловленный ингибированием активности ангиотензина II через трансмембранный сигнальный путь c-Raf в эпителиальных клетках клубочков. [Mima и др., 2012] При двойном иммуногистохимическом окрашивании было отмечено уменьшение экспрессии рГПП-1 на 43 +/-12 % в эндотелиальных

клетках клубочков, на 35 ± 9 % в лизатах коркового вещества в группе диабета по сравнению с группой контроля без диабета. Исследование показало, что гипергликемия вызывает дисфункцию эндотелия вследствие активации бета-изоформы ПКС, приводящей к избыточному образованию ангиотензина II и ингибитора активации плазминогена PAI-1 благодаря фосфорилированию c-Raf Ser338, а также редукции количества рГПП в эндотелиальных клетках.

Протективные эффекты а-рГПП-1 на функцию почек на моделях с СД 2 типа, которые отчасти могли быть объяснены улучшением метаболических параметров (снижение веса, уменьшение количества жировой ткани, снижение уровня циркулирующих свободных жирных кислот (СЖК) и триглицеридов (ТГ), улучшение чувствительности к инсулину), были получены также в работах на моделях с СД 1 типа. [Hendarto и др., 2012] , [Kodera и др., 2011]

В работе Hendarto и соавт. крысам со стрептозотоцин-индуцированным СД 1 типа осуществлялись подкожные инъекции аналога а-рГПП-1 лираглутида в дозе 0,3 мг/кг/12 ч в течение 4 недель. Через 4 недели после инфузии лираглутида оценивались величина суточной экскреции 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 8-гидрокси-2- дезоксигуанозин) и MDA (малондиальдегид), маркеров несистемного оксидативного стресса и альбумина, уровень которых был значимо повышен у крыс из группы диабета. [Hendarto и др., 2012] Терапия лираглутидом приводила к достоверному снижению экскреции 8-OHdG 8-гидрокси-2- дезоксигуанозина и малондиальдегида в группе терапии (были значительно выше в группе диабета по сравнению с группой контроля и снижались после инфузии лираглутида (9.8 ± 1.7 мг/г; $p < 0.01$). Экскреция альбумина в моче в группе диабета (21.4 ± 4.7 мг/г; $p < 0.001$ была значимо выше, по сравнению с группой контроля (4.7 ± 0.7 мг/г), и значимо снижалась после инфузии лираглутида. Иммуногистохимический анализ выявил выраженное повышение экспрессии

транскриптов мРНК основных компонентов НАД(Ф)Н-оксидазы - NOX4, p22phox, Nox2, p47phox, а также TGF- β и его предшественника фибронектина. Введение лираглутида приводило к нормализации экскреции альбумина, экспрессии TGF- β и фибронектина в группе диабета параллельно с нормализацией уровня экскреции маркеров оксидативного стресса и экспрессии основных компонентов НАД(Ф)Н-оксидазы независимо от его сахароснижающего действия.

В исследовании Kodera терапия эксендином также приводила к достоверному увеличению количества ГПП-1 позитивных клеток в клубочках, уменьшению АУ, клубочковой гипертрофии, макрофагальной инфильтрации и снижению клубочкового и тубулоинтерстициального фиброза у крыс с СД 1 типа, независимо от его сахароснижающего действия. [Kodera и др., 2011]

а-рГПП-1 и аутофагоцитоз.

Окислительный стресс, аккумуляция конечных продуктов гликозилирования, активации протеинкиназы С, нарушение полиолового пути, гиперэкспрессия TGF- β , индукция воспаления - основные патогенетические субстраты развития и прогрессирования ДН приводят к развитию внутриклеточного стресса, опосредованного почечной гипоксией, что сопровождается активацией процессов аутофагоцитоза. [Singh и др., 2008], [Miyata и др., 2010], [Cybulsky и др., 2011] Аутофагоцитоз (цитоплазматическая гибель клетки или запрограммированная смерть клеток II) - жестко регулируемый клеточный процесс, в котором эндогенные белки и поврежденные клеточные органеллы деградируются в лизосомах. Этот механизм необходим для поддержания внутриклеточного гомеостаза и целостности клеток, особенно в органах с высокой метаболической активностью. Высказаны предположения о возможной протективной роли аутофагоцитоза при различных патологических процессах в почках, в том числе при старении и остром почечном повреждении. [Hartleben и др., 2010],

[Kimura и др., 2011]. Баланс между «выжившими» и «погибшими» клетками эпителия почечных канальцев играет важную роль в патогенезе ДН, а нарушение процессов аутофагоцитоза может приводить к уменьшению массы клеток эпителия канальцев. Так, было показано, что высокие концентрации глюкозы индуцируют процессы аутофагоцитоза как в человеческих ренальных эпителиальных клетках канальцев (НК-2 клетки), так и в почках экспериментальных животных с СД, в то время как введение α -рГПП-1 оказывало цитопротективное действие. [Zhao и др., 2015] Длительная экспозиция эпителия почечных канальцев (НК-2 клетки) в течение 72 ч в пробирках с высокой концентрацией глюкозы приводила к нарушению экспрессии рГПП-1. Методом электронной микроскопии было выявлено увеличение количества преаутофагосомальных структур в цитоплазме уже через 48 ч. после введения глюкозы. В ходе более длительной экспозиции с глюкозой отмечались типичные апоптотические изменения - конденсация хроматина, фрагментация ядер, вакуолизация цитоплазмы, а также повышение экспрессии маркеров аутофагоцитоза LC3-II (легкие цепи 3 протеина 1, ассоциированного с микротрубочками) и Beclin1, генов, регулирующих образование аутофагосом. Введение лираглутида к культуре клеток вызывало дозозависимое повышение жизнеспособности клеток и экспрессии LC3-II and Beclin1.

В том же исследовании, но уже на модели аутбредных крыс Sprague-Dawley со стрептозотоцин-индуцированным СД 1 типа было отмечено появление типичных морфологических диабетических изменений структуры почек (канальцевая и клубочковая гипертрофия, вакуолярная дегенерация), повышение экспрессии LC3-II по сравнению с группой контроля, регрессировавшие после введения крысам лираглутида. В то время как введение антагониста α -рГПП-1 эксендина-9 -39 к культуре эпителиальных клеток и экспериментальным животным нивелировала эти изменения,

подтверждая гипотезу о том, что ренопротективные эффекты лираглутида опосредованы повышением экспрессии рГПП-1 в почках.

Заключение.

Таким образом несмотря на достижение оптимального контроля гликемии и активное применение блокаторов РААС, пациенты с ДН по-прежнему находятся в группе риска прогрессирования заболевания, что указывает на многофакторный патогенез развития ДН. Плейотропные экстрапанкреатические эффекты а-рГПП-1 представляют большой клинический потенциал и, возможно, открывают новые перспективы нефропротекции у больных СД.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Исследование проводилось с использованием клинического материала отделения диабетической болезни почек и посттрансплантационной реабилитации Института диабета ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (директор – академик РАН Шестакова М.В.). Клинические и биохимические исследования выполнялись на базе клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (заведующий лабораторией к.м.н. Никанкина Л.В.).

Диссертационная работа была выполнена в 2 этапа (рис. 1):

1 этап - одномоментное исследование: оценка диагностической значимости исследуемых мочевых и плазменных биомаркеров у пациентов с СД 1 типа.

2 этап – проспективное исследование: изучение влияния терапии а-рГПП-1 (лираглутид в дозе 1,2 мкг/сут) в течение 6 месяцев на динамику уровня плазменных и мочевых биомаркеров ДН при добавлении к инсулинотерапии у пациентов с СД 1 типа

I. Одномоментное исследование: оценка диагностической значимости исследуемых биомаркеров.

В исследование было включено 105 пациентов с СД 1 типа (49 мужчин, 56 женщин), находившихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» в период времени с 2014-2016 гг., и удовлетворяющие критериям включения. Выборка была этнически однородна.

Все пациенты с СД 1 типа были распределены по уровню экскреции альбумина (ЭА) на 3 группы в соответствии с классификацией KDIGO: A1 (<0-20 мг/л), n=42; A2 (20-200 мг/л), n=43, A3 (>200 мг/л), n=20.

В группу контроля было включено 37 человек без нарушений углеводного обмена и поражения почек из числа добровольцев (сотрудники,

ординаторы) ФГБУ «НМИЦ эндокринологии», сопоставимых по возрасту и полу с исследуемой группой СД.

Все пациенты, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие на участие в научно-исследовательском протоколе.

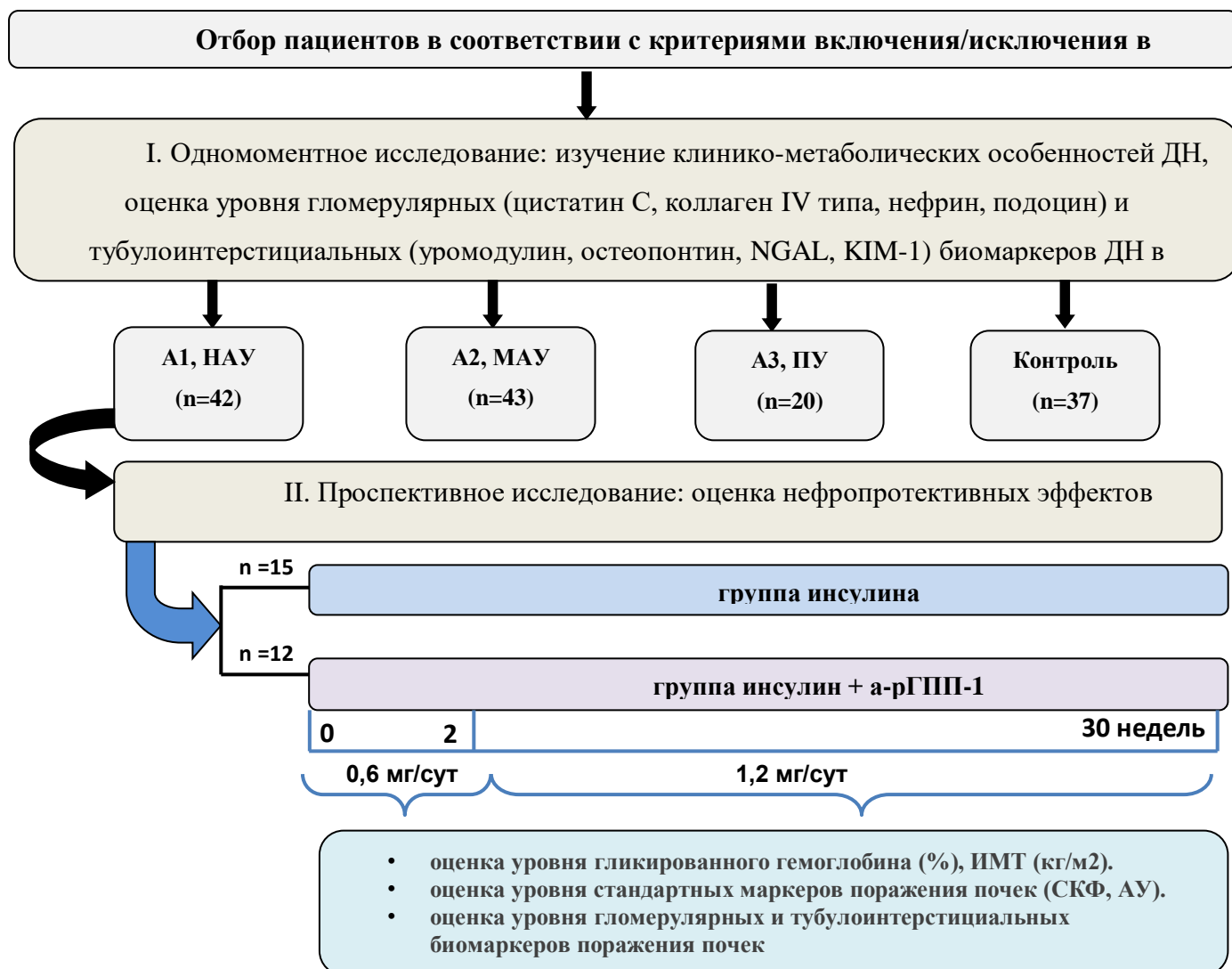


Рис. 1. Схема дизайна исследования.

Критерии включения:

1. Hb A1c < 10,0 %
2. В группе A1 отсутствие терапии иАПФ или блокаторами рецепторов ангиотензина II (БРА) в течение 3-х месяцев до и на протяжении всего

периода исследования; в группах А2 и А3 - терапия иАПФ/БРА в стабильной дозе, не меняющаяся в течение 3-х месяцев до включения и на протяжении всего периода исследования.

3. Подписанное информированное согласие.

Критерии исключения:

1. HbA1c > 10,0 %
2. ХБП 4-5 ст. (СКФ <30 мл/мин/1,73 м² по формуле MDRD), заместительная почечная терапия.
3. Сердечная недостаточность III-IV функциональных классов в соответствии с классификацией хронической сердечной недостаточности NYHA.

Для выделения панели биомаркеров доклинической диагностики был разработан алгоритм диагностического поиска, (рис. 2).

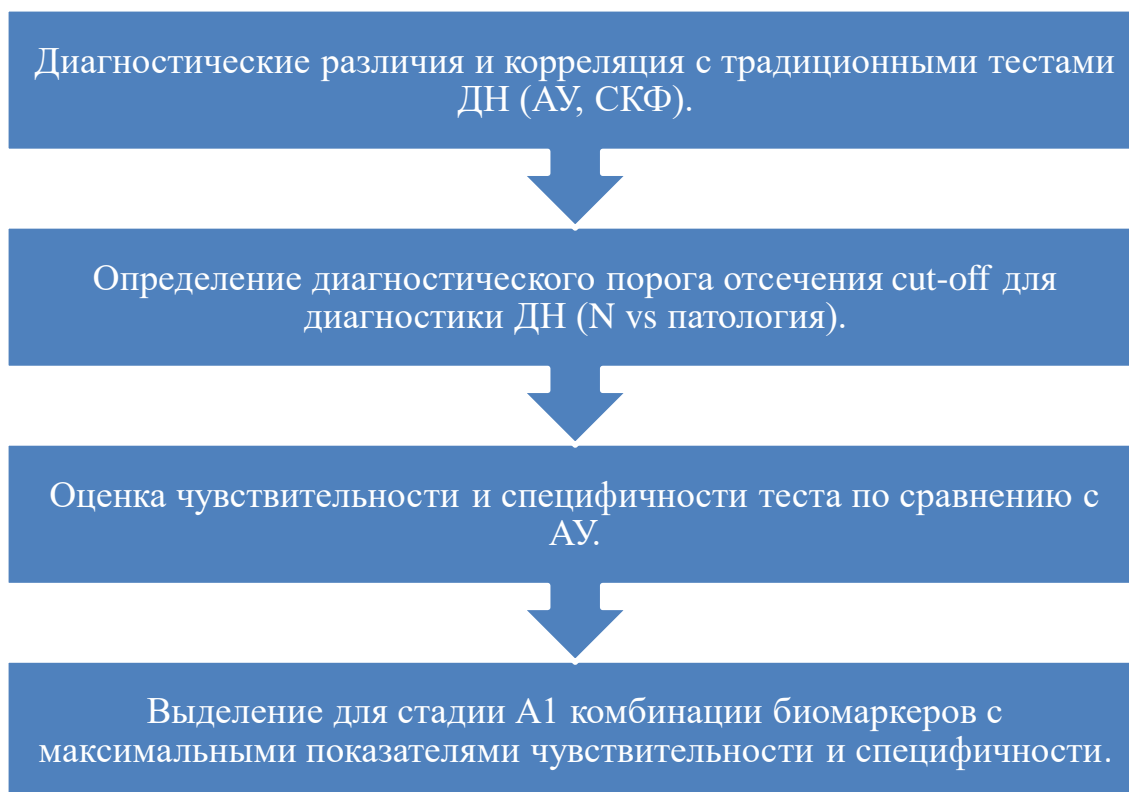


Рис. 2. Алгоритм диагностического поиска панели биомаркеров.

I. Проспективное исследование: оценка нефропротективных эффектов терапии а-рГПП-1.

В проспективной части работы пациенты из группы А1 с повышенными уровнями исследуемых биомаркеров были разделены на 2 группы: группа инсулина, продолжившая интенсифицированную инсулинотерапию (8 мужчин, 7 женщин); группа инсулин + а-рГПП-1 (6 мужчин, 6 женщин), в которой к инсулину были добавлены ежедневные инъекции лираглутида 1 раз в сутки. Стартовая доза лираглутида составляла 0,6 мг/сутки в течение 2-х недель с последующим увеличением дозы до 1,2 мг/сутки. Период терапии 6 месяцев.

На момент включения и через 6 месяцев наблюдения у всех пациентов исследовались HbA1c, липидный профиль, стандартные маркеры ДН (креатинин, СКФ, АУ), а также гломерулярные и тубулоинтерстициальные биомаркеры поражения почек в крови (цистатин С, нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (NGAL), молекула почечного повреждения 1 типа (KIM-1), остеопонтин) и в моче (коллаген IV типа, нефрин, подоцин, уромодулин, цистатин С, NGAL, KIM-1).

Критерии включения:

1. HbA1c <10,0 %;
2. АУ на уровне А1 (0-20 мг/л в разовой порции мочи), сохранная функция почек (СКФ СКД EPI >60 мл/мин/1,73 м²)
3. Стабильная доза средств, блокирующих ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС) в течение 3-х месяцев до и на протяжении всего периода исследования, с целью исключения влияния данного фактора на уровни ренальных маркеров
4. Подписанное информированное согласие.

Критерии исключения из исследования:

1. Беременность, кормление грудью или женщины, планирующие беременность

2. Повторные тяжелые гипогликемии или отсутствие ощущений гипогликемии.
3. Нарушение функции печени, определенное как АЛТ, АСТ $\geq 2,5$ раз выше верхней границы нормы.
4. Хронический панкреатит или идиопатический острый панкреатит в анамнезе.
5. В течение последних 180 дней любое из нижеперечисленного: приступ нестабильной стенокардии, острый коронарный синдром, инсульт/транзиторная ишемическая атака или другие значимые сердечно-сосудистые события (включая аритмию или нарушения проводимости на ЭКГ).
6. Сердечная недостаточность IV ФК согласно Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).
7. Систолическое артериальное давление > 180 мм рт. ст. и/или диастолическое артериальное давление > 100 мм рт. ст.
8. СКФ < 60 мл/мин/1,73 м² (ХБП СЗБ). Быстро прогрессирующее заболевание почек (например, острый гломерулонефрит)
9. Диагностированное или пролеченное онкологическое заболевание в течение предыдущих 5 лет
10. Семейный анамнез или наличие в индивидуальном анамнезе медуллярной карциномы щитовидной железы (МКЩЖ) или синдрома множественной эндокринной неоплазии II типа (МЭН 2).

Вопросы снабжения.

На время обследования пациенты из группы терапии снабжались исследуемым препаратом лираглутид (Виктоза, NovoNordisk) при визитах к врачу-исследователю 1 раз в месяц в течение 6 месяцев.

Этическая экспертиза.

Исследование было одобрено на заседании локального этического комитета 13.11.2013 (выписка из протокола №11-13).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Объективное обследование.

Объективное обследование включало сбор жалоб, анализ анамнестических данных, объективный осмотр.

Сбор анамнестических данных включал:

- возраст;
- время дебюта и длительность СД 1 типа;
- время начала и длительность снижения почечной функции (появление МАУ/снижение СКФ);
- ИМТ;
- уровень липидного профиля (ХС, ЛПНП, ТГ, ЛПВП);
- наличие, уровень и длительность АГ (САД и ДАД);
- данные о приеме (длительности) препаратов из группы иАПФ/БРА;
- статус курения;
- наличие сопутствующей соматической патологии;

Объективное обследование включало сбор жалоб, антропометрическое обследование, измерение температуры тела, артериального давления (АД), обследование органов кровообращения и дыхания, пальпацию живота, наличие перитонеальных и почечных симптомов, определение наружных отеков. Расчет индекса массы тела (ИМТ) производился по формуле отношения массы тела в килограммах к квадратному значению роста, выраженному в метрах ($\text{кг}/\text{м}^2$). Пациенты были осмотрены кардиологом, специалистом кабинета диабетической стопы, офтальмологом, неврологом.

2.2.2. Лабораторно-инструментальное обследование.

Всем пациентам было проведено стандартное лабораторное обследование на базе биохимической лаборатории ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» (зав. – к.м.н. Никанкина Л.В.). Обследование включало клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови (холестерин, триглицериды, ЛПВП, ЛПНП, креатинин, мочевины, мочевая кислота, С-реактивный белок), коагулограмму, определение АУ, оценка соотношения альбумин/креатинин в утренней порции мочи. Забор крови на все исследования – клинические, биохимические и другие – проводился из кубитальной вены строго натощак.

Компенсация углеводного обмена оценивалась по уровню гликированного гемоглобина (HbA_{1c}), определяемого методом ионно-обменной хроматографии на автоматическом биохимическом анализаторе «Diastat» (Bio-RAD, США) с использованием набора того же производителя по стандартной методике производителя.

Общий анализ крови проводился на гематологическом автоматическом анализаторе «Sysmex XE-2100 D». Физико-химические свойства мочи определялись на аппарате фирмы «ARKRAY Autin Max AX-4280» и микроскопически с использованием микроскопа Nikon Eclipse E 200.

Оценка липидного обмена (ТГ, общего ХС, ЛПВП, ЛПНП) изучалась на автоматическом биохимическом анализаторе «Architect plus C 4000» («Abbott Diagnostics», США) по стандартным методикам с использованием реагентов производителя.

Определение уровня креатинина в сыворотке крови проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе «Architect plus C 4000» («Abbott Diagnostics», США) по стандартным методикам с использованием реагента производителя.

Всем пациентам производился расчет скорости клубочковой фильтрации по стандартной формуле СКД EPI: $СКФ (мл/мин/1,73м^2) = 141 \times$

$[\text{min креатинин плазмы (мг/дл)}/k \text{ или } 1]^\alpha \times [\text{max креатинин плазмы (мг/дл)}/k \text{ или } 1]^{-1,209} \times 0,993^{\text{возраст (лет)}} \times 1,018 \text{ (для женщин)} \times 1,159 \text{ (для представителей негроидной расы)}$, где $k - 0,7$ для женщин и $0,9$ для мужчин, $\alpha - (-0,329)$ для женщин и $(-0,411)$ для мужчин, креатинин (мкмоль/л) = креатинин (мг/дл) $\times 88,4$.

Экскрецию альбумина с мочой, соотношение альбумин/креатинин определяли в утренней порции мочи иммунотурбидиметрическим методом с использованием стандартного набора на автоматическом анализаторе Beckman Coulter по методике производителя.

2.2.3. Специальные методы исследования.

Забор образцов крови осуществлялся утром после 12-часового ночного голодания в пробирки с ЭДТА. После центрифугирования со скоростью 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут аликвоты плазмы крови замораживались при температуре -70 гр. Мочевые концентрации биомаркеров (NGAL, KIM-1, коллаген IV типа, подоцин, уромодулин, цистатин C) определяли в образцах утренней порции мочи. В течение часа после сбора образцы мочи центрифугировались со скоростью 3000 оборотов в минуту в течение 15 минут для отделения мочевого осадка, аликвоты мочи замораживались при температуре -70 . Анализ плазменных и мочевых биомаркеров проводился методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем фирм: BioVendor (NGAL, цистатин C, уромодулин), USCN (KIM-1, подоцин), eBioscience (TGF- β 1, VEGF-A, остеопонтин), BCM Diagnostics (коллаген IV типа), Cusabio (нефрин). После оттаивания образцы мочи и плазмы последовательно разводились в соответствии с инструкциями производителей, оптическая плотность образцов оценивалась при длине волны 450 нм с использованием автоматического планшетного ELISA ридера Victor2™ (Perkin Elmer, США). Вычисление

концентрации осуществляли с помощью программы Workout 2.5 (Perkin Elmer, Англия). Вычисленные концентрации мочевых биомаркеров были нормализованы по уровню креатинина мочи.

2.3 Статистическая обработка результатов.

В работе анализировалась выборка объемом 105 наблюдений, каждое наблюдение содержало 25 переменных, из которых 1 признак был дискретным качественным и 24 признака непрерывными количественными. Анализ пропущенных значений показал наличие случайных пропусков данных (MAR), доля пропущенных значений составила 5 %. Для работы с пропущенными значениями использовался метод множественной импутации данных. Проверка нормальности распределения количественных признаков осуществлялась с использованием критерия Шапиро-Уилка, проверка равенства генеральных дисперсий с помощью критериев Фишера и Кохрэна. Данные с ассиметричным распределением анализировались с использованием методов непараметрической статистики. Для оценки значимости качественных характеристик выборки использовался анализ таблиц сопряженности с применением критерия хи-квадрат. Количественное сравнение двух независимых выборок осуществлялось с использованием U-критерия Манн-Уитни, для количественного сравнения трех и более независимых выборок использовался дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Для исследования взаимосвязи между признаками (двумя ранговыми переменными) использовался ранговый корреляционный анализ Спирмена. Выборочные параметры, приводимые далее в таблицах, имеют следующие обозначения: результаты с распределением отличным от нормального представлены как медианы и интерквартильный размах (25-й и 75-й процентиля); n - объем анализируемой подгруппы, p - достигнутый уровень значимости. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным $p < 0,05$.

Диагностическая точность биомаркеров оценивалась с помощью анализа характеристических кривых (ROC – анализ). Оценивались следующие классические индексы бинарных диагностических целей: площадь под характеристической кривой (AUC ROC), чувствительность, специфичность. Оценка качества модели проводилась в соответствии с экспертной шкалой для значений AUC, (табл. 2). Оптимальное значение cut-off для каждого биомаркера определялось на основании максимальной оценки чувствительности и специфичности теста, основанного на доле правильно классифицированных пациентов в соответствии с наибольшим значением индекса Юдена.

Статистический анализ проводился в пакете прикладных программ SPSSv23 Statistics. ROC-анализ осуществлялся в программе MedCalc, версия 18.2.1. (MedCalc Software, Бельгия).

Таблица 2. Шкала значений AUC.

Интервал AUC	Качество модели
0,9-1,0	отличное
0,9-0,8	очень хорошее
0,7-0,8	хорошее
0,6-0,7	среднее
0,5-0,6	неудовлетворительное

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Одномоментное исследование: оценка диагностической значимости исследуемых биомаркеров.

3.1.1. Клиническая характеристика обследованных больных

Клиническая характеристика исследуемых групп представлена в табл.

3. Пациенты из группы здорового контроля и СД были сопоставимы по полу, возрасту и основным клиническим параметрам, влияющим на функцию почек (ИМТ, АД, HbA1c).

Таблица 3. Клиническая характеристика группы СД и здорового контроля.

Параметры	контроль (n=37)	A1 (n=42)	A2 (n=43)	A3 (n=20)	p
Пол (м/ж)	16/21	21/21	19/25	9/10	0,29*
Возраст, лет	32 [28; 38]	29 [24; 42]	32 [26; 41]	30 [28; 33]	0,06
ИМТ, кг/м ²	23 [22; 26]	23 [22; 26]	23 [21; 26]	22[19; 25]	0,35
Длительность СД, лет	-	14 [10; 22]	18[11; 25]	20[17; 27]	0,05 ^b
Систолическое АД, мм рт. ст.	110[105; 120]	120[117; 132]	120[115; 130]	120[110; 130]	0,29
Диастолическое АД, мм рт. ст.	68[60; 70]	80[70; 80]	80[70; 80]	75[70; 80]	0,83
Гликированный гемоглобин (HbA1c) %	4,4 [5,1; 5,6]	8,6 [7,5; 9,6]	8,5[7,6; 9,7]	8,1[7,5; 9,4]	0,14 ^b
Мочевая кислота, мкмоль/л	316 [230; 364]	272[247; 304]	273[241; 316]	337[310; 453]	0,02 ^d

Холестерин, ммоль/л	5,1 [4,3; 6,1]	4,7[4,1; 5,6]	4,9[3,9; 5,6]	5,5[4,2; 6,8]	0,3 ^a
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	3,0[2,6; 5,56]	3,0 [2,4; 5,0]	2,7 [2,2; 4,9]	3,5 [2,3; 5,8]	0,06 ^a
Триглицериды, ммоль/л	0,84 [0,57; 1,72]	0,92 [0,79; 1,41]	0,9 [0,68; 1,71]	1,06 [0,81; 1,41]	0,82
Креатинин, мкмоль/л	69,5[69; 74]	72[64; 82]	72[62; 85]	117[74; 222]	0,001 ^d
СКФ (СКД ЕРІ), мл/мин/1,73 м²	103[97; 110]	107[96; 120]	107[81; 119]	44[35; 80]	0,004 ^d
Альбумин, мг/л	6 [2; 10]	10[5; 14]	35[27; 47]	829[454;177 5]	0,001 ^c 0,001 ^d

*- критерий χ^2 -квадрат

a - сравнение группы СД и здорового контроля с помощью U-критерия Манна-Уитни

b - межгрупповые сравнения в группе СД с помощью рангового анализа вариаций ANOVA Краскела-Уоллиса

c - попарное сравнение групп А1 и А2 с помощью U-критерия Манна-Уитни

d- сравнение групп А2 и А3 с помощью U-критерия Манна-Уитни

Осложнения СД.

Диабетическая ретинопатия была выявлена у 68 больных (68 %), из них 34 больных (50%) с непролиферативной стадией ДР, 3 больных (4,4 %) - препролиферативной ДР, 31 пациент (45,5 %) с пролиферативной формой.

Дистальная диабетическая полинейропатия выявлена у 80 пациентов (80%). Автономная форма нейропатии выявлена у 23 больных (23 %), из них нераспознавание гипогликемий выявлено у 3 больных (13 %), у 6 больных кардиоваскулярная форма автономной нейропатии (26 %), у 1 пациента урогенитальная форма (4,3%), 2 больных (8,6%) гастроинтестинальная форма, сочетание нераспознавания гипогликемий и кардиоваскулярной формы имелось у 6 пациентов (26 %), кардиоваскулярной и гастроинтестинальной

форм – у 2 пациентов (8,6%), урогенитальной и гастроинтестинальной формы у 1 пациента (4,3%), нераспознавание гипогликемий, кардиоваскулярной и урогенитальной нейропатии у 1 пациента (4,3%), нераспознавание гипогликемий, кардиоваскулярной и гастроинтестинальной у 1 пациента (4,3%).

Макрососудистые осложнения СД выявлены у 25 больных (25%), из них у 1 пациента имелась ишемическая болезнь сердца: стенокардия напряжения (4 %), у 17 пациентов различные формы (облитерирующий, нестенозирующий) атеросклероза артерий нижних конечностей (68%), у 3 пациентов – медиакальциноз артерий (12%), у 2 пациентов имелось сочетание атеросклероза артерий нижних конечностей и медиакальциноза (8 %), и еще у 2 больных сочетание атеросклероза и ишемической болезни сердца (8%).

Синдром диабетической стопы был выявлен у 3 пациентов (3%), у 3 пациентов (3 %) имелась хроническая стадия диабетической остеоатрофии.

Сопутствующие заболевания.

Артериальная гипертензия (АГ) выявлена у 42 больных (42%), из них у 12 больных АГ 1 ст., у 26 АГ 2 ст., у 4 больных АГ 3 ст.

Сопутствующая эндокринная патология выявлена у 16 больных (16%), из них у 7 первичный гипотиреоз в исходе аутоиммунного тиреоидита, у 3 послеоперационный гипотиреоз, у 4 больных узловой/многоузловой зоб, у 1 пациента имелось фолликулярное новообразование щитовидной железы, у 1 пациента гормонально-неактивная аденома гипофиза.

Лечение.

75 больных находилось на интенсифицированной инсулинотерапии аналогами инсулина ультракороткого (НовоРапид, Апидра, Хумалог) и ультрадлинного действия (Лантус, Левемир) в режиме многократных инъекций с помощью шприц-ручек. 20 человек находилось на непрерывной инсулинотерапии инсулином ультракороткого действия с помощью индивидуально-носимого дозатора (помпа). 51 больной получал

антигипертензивную и/или нефропротективную терапию в виде монотерапии или в сочетании нескольких групп препаратов. Из них 12 человек из группы А1. Так, на монотерапии препаратами из группы иАПФ или БРА находилось 11 и 1 человек, соответственно. 6 пациентов находились на сочетанной терапии иАПФ и бета-блокаторами, 1 пациент на комбинации иАПФ и антагонистами кальциевых каналов, 2 пациента – иАПФ и диуретики, 1 пациент получал сочетанную терапию БРА и бета-блокатором, 1 пациент сочетание бета-блокатора и диуретика. Остальные пациенты находились на терапии 3 и более препаратами в различных комбинациях. 29 больных получали постоянную антиагрегатную терапию ацетилсалициловой кислотой. 45 пациентов получали постоянную гиполипидемическую терапию статинами.

3.1.2. Мочевые биомаркеры.

При анализе экскреции мочевых биомаркеров выявлены достоверные различия между группами здорового контроля и группой А1 в уровне следующих показателей: нефрин, подоцин, коллаген IV типа, уромодулин, цистатин С.

Мочевая экскреция подоцитспецифичных белков (нефрин, подоцин) в группе СД достоверно превышала показатели у здоровых лиц ($p=0,01$ и $p=0,03$, соответственно), (рис. 3,6). Медиана нефринурии в группе А1 (0,11 [0,08;0,22]) больных СД была статистически выше при сравнении со здоровым контролем (0,06 [0,05;0,11]), (рис. 2).

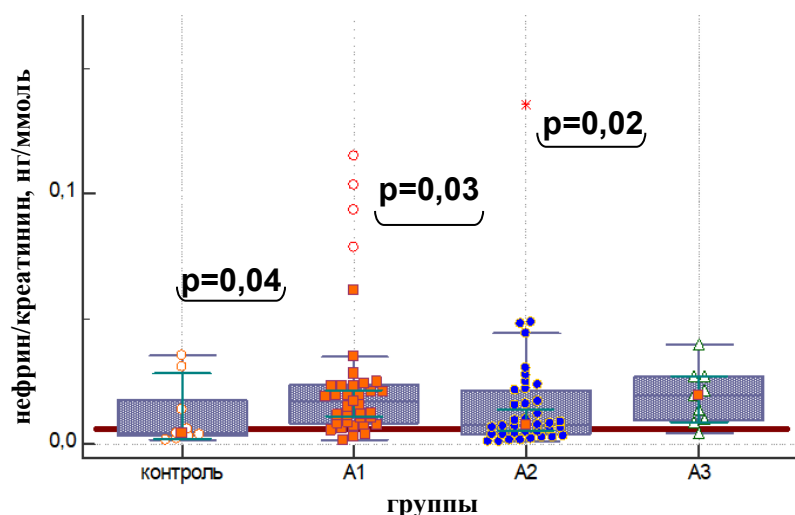


Рис. 3. Нефрин/креатинин в моче, нг/ммоль.

Мочевая экскреция нефрина имела умеренную корреляционную взаимосвязь с длительностью заболевания ($r=0,3$, $p=0,01$) и уровнем АУ ($r=0,3$, $p=0,02$), (рис. 4,5).

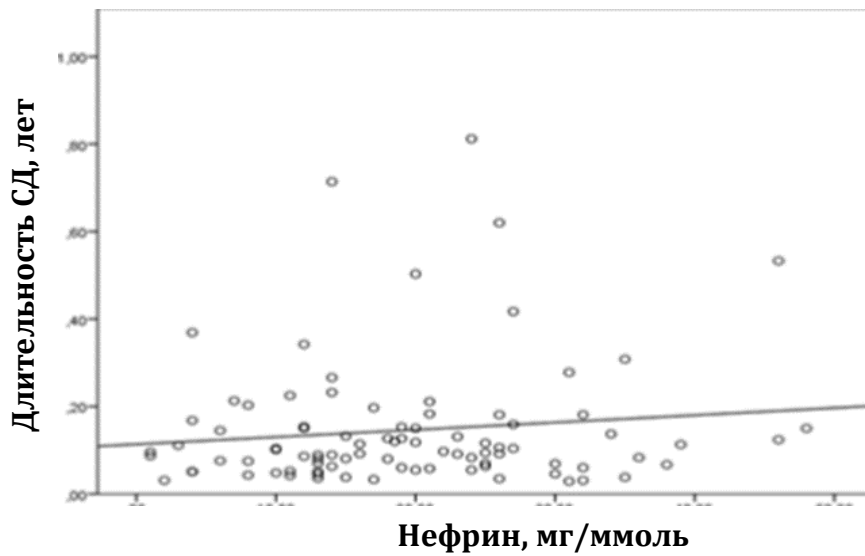


Рис. 4. Корреляция нефрина с длительностью СД, лет.

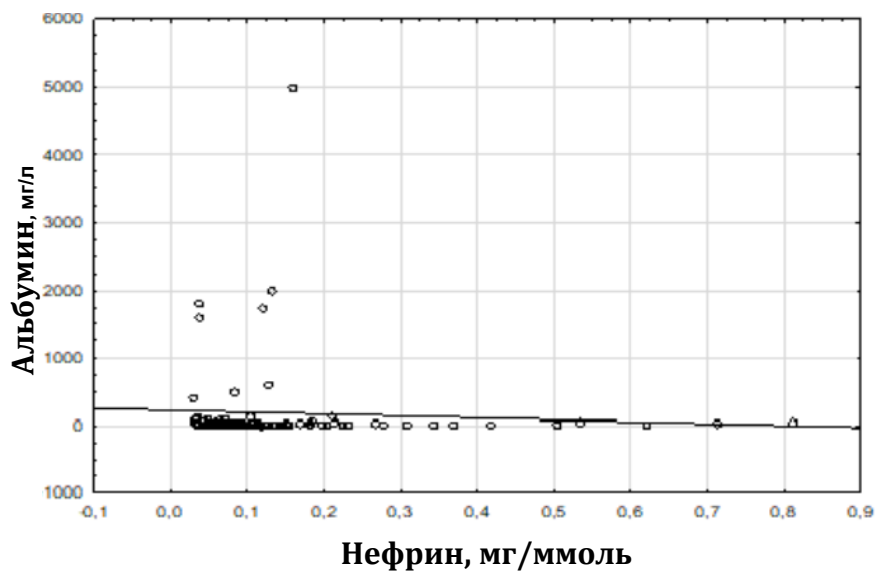


Рис. 5. Корреляция нефрина с уровнем АУ, мг/л.

Медиана подоцина в группе А1 (0,03 [0,01;0,11]) также достоверно превышала показатели у здорового контроля (0,00 [0,00;0,03]), значимо повышаясь на стадии А3 (1,89 [0,12;3,60]), (рис. 6).

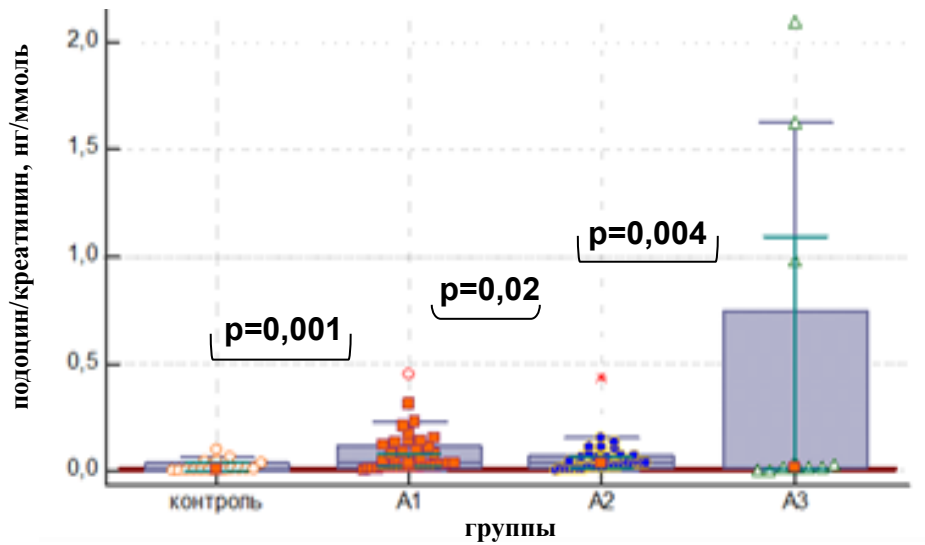


Рис. 6. Подоцин/креатинин в моче, нг/ммоль.

При определении взаимосвязи с классическими маркерами ДН установлена корреляция между уровнем подоцина СКФ ($r=0,41$, $p=0,008$) и креатинином крови ($r=-0,44$, $p=0,04$), (рис. 7,8).

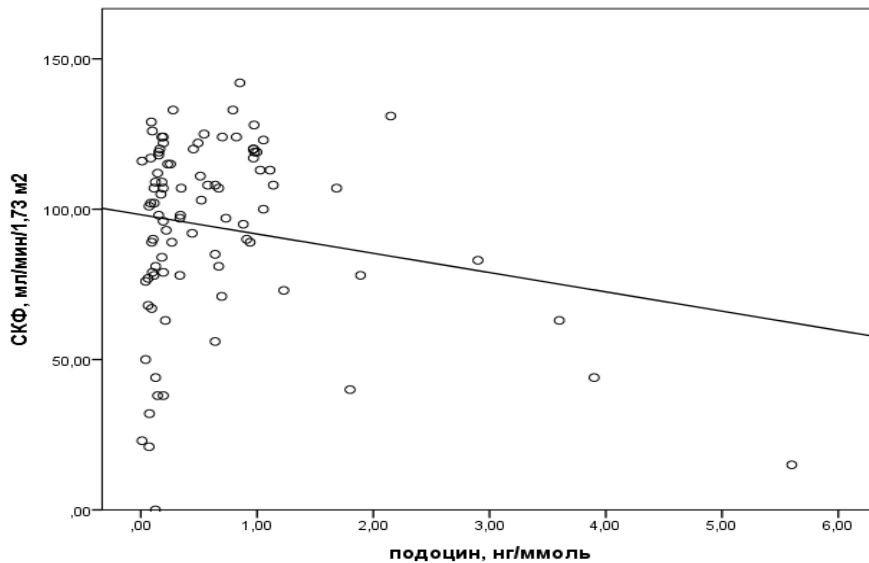


Рис. 7. Корреляция подоцина с уровнем СКФ, мл/мин/1,73 м².

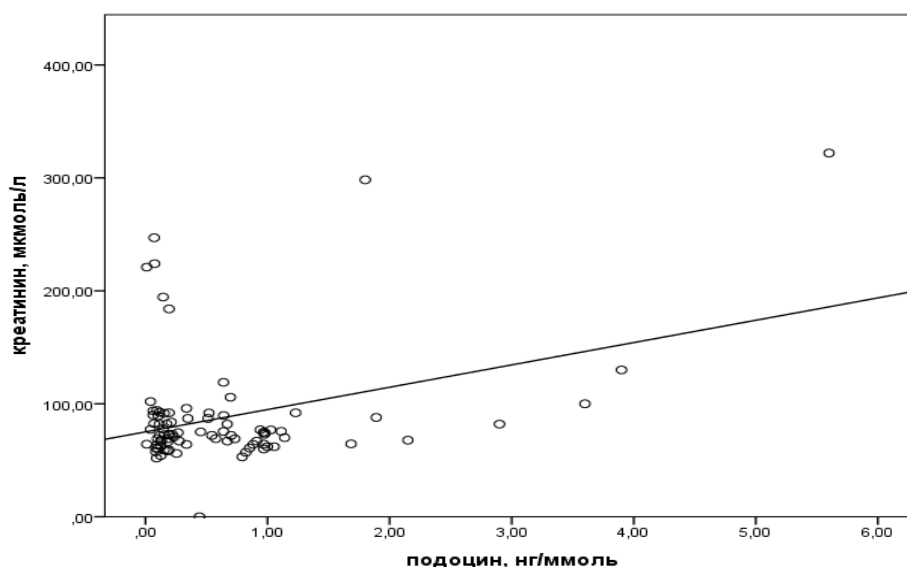


Рис. 8. Корреляция подоцина с уровнем креатинина крови, мкмоль/л.

При оценке уровня мочевой экскреции коллагена IV типа отмечено достоверное повышение коллагенурии у больных СД, медиана экскреции в группе СД составляла 0,3[0,22;0,6] и достоверно превышала показатели у здоровых лиц 0,03[0,01;0,03], $p < 0,001$. Повышение экскреции коллагена IV типа отмечалось уже на стадии А1 (0,43 [0,23; 0,74]), достоверно превышая показатели у здорового контроля (0,18 [0,07; 0,34]), и увеличиваясь по мере прогрессирования ДН от стадии А1 к А3 (рис. 9). Наибольшая коллагенурия была зафиксирована у пациентов в группе А3 (3,00 [1,60; 4,07]), медиана экскреции в этой группе превышала показатели в группе здорового контроля в 16 раз и была достоверно выше, чем у больных из групп А1 и А2 (1,17 [0,28; 1,92]).

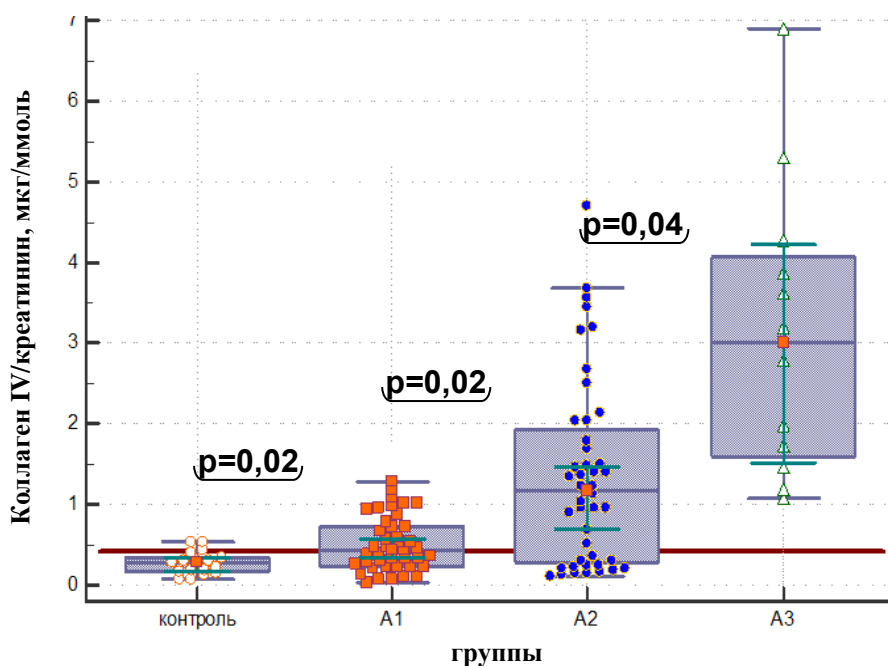


Рис. 9. Коллаген IV типа/креатинин в моче, мкг/ммоль.

При анализе корреляционных взаимосвязей выявлена достоверная связь между уровнем экскреции коллагена IV типа и креатинином крови ($r=0,4$; $p=0,003$), АУ ($r=0,45$; $p=0,01$), уровнем мочевой кислоты ($r=0,45$; $p=0,002$), холестерином крови ($r=0,42$; $p=0,002$), а также с длительностью СД ($r=0,31$; $p=0,02$). Отрицательная корреляционная взаимосвязь установлена между уровнем коллагена и СКФ ($r= - 0,55$; $p < 0,001$), (рис. 10,11).

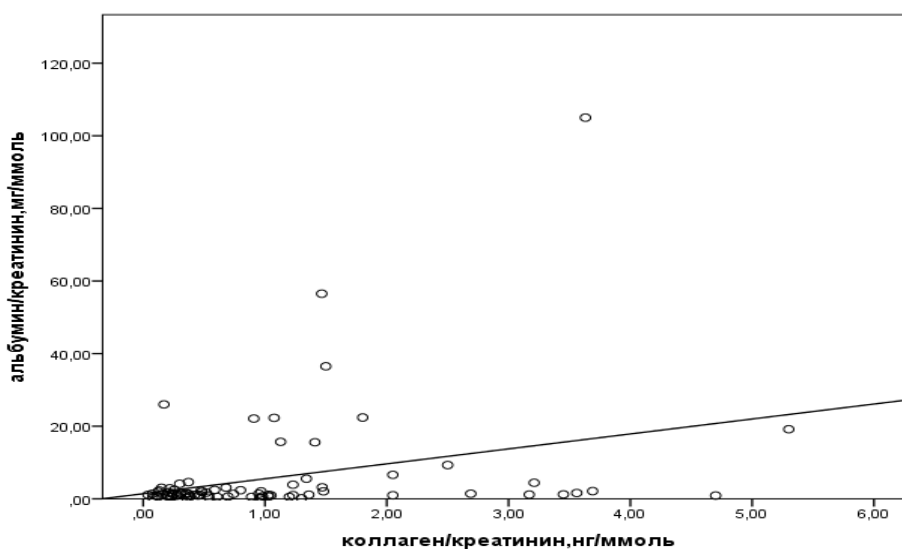


Рис. 10. Корреляция коллагена IV типа с уровнем АУ, мг/ммоль.

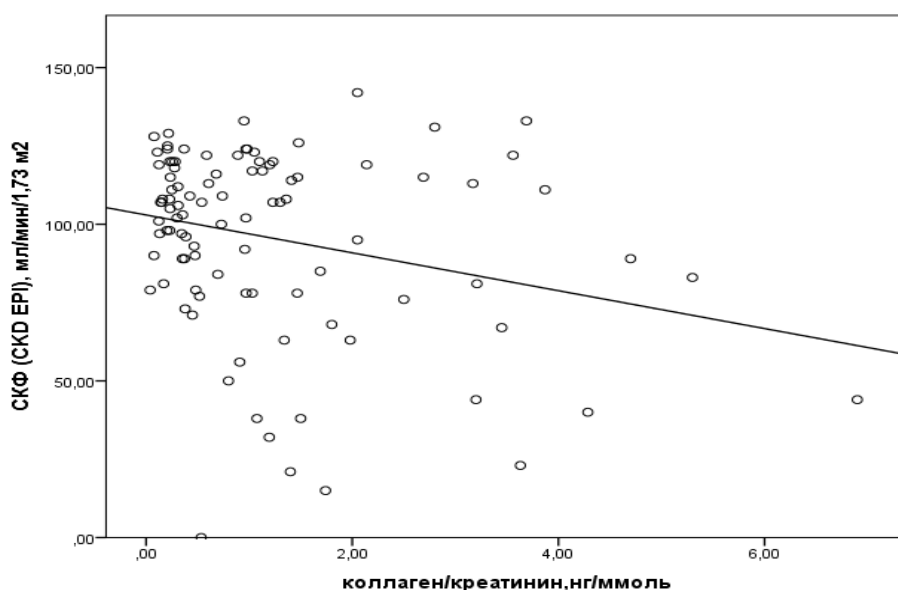


Рис. 11. Корреляция коллагена IV типа с уровнем СКФ, мл/мин/1,73 м².

Медиана мочевой экскреции уромодулина в группе больных СД была значительно ниже, чем у здорового контроля (179,1 [77,8;318,2] и 421,0 [324,6;497,4], соответственно), указанные различия носили статистически значимый характер ($p < 0,001$). У пациентов в группе А1 и А2 отмечалось значимое снижение экскреции уромодулина по сравнению с группой здорового контроля: 243,4 [107,0; 749,7] и 205,6 [98,0; 565,0], соответственно. Снижение уровня уромодулина в группе А3 (252,01 [145,73; 329,65]) не имело достоверных различий по сравнению с группами А1 и А2, (рис. 12).

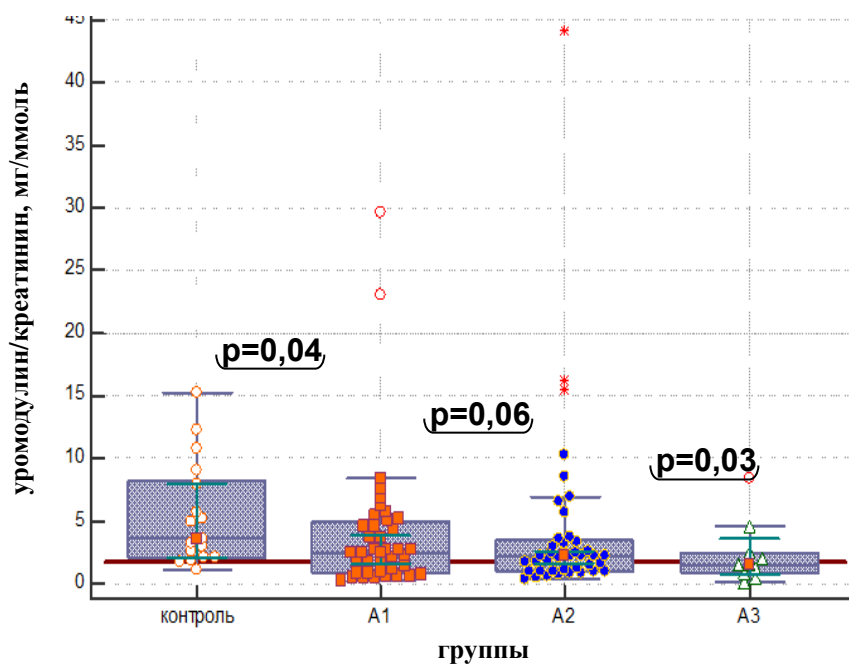


Рис. 12. Уромодулин/креатинин в моче, мг/ммоль

При ранговом корреляционном анализе установлена прямая взаимосвязь между уровнем экскреции уромодулина и СКФ ($r=0,49$; $p=0,05$), обратная взаимосвязь с уровнем креатинина крови ($r=-0,33$; $p=0,05$), (рис. 13,14).

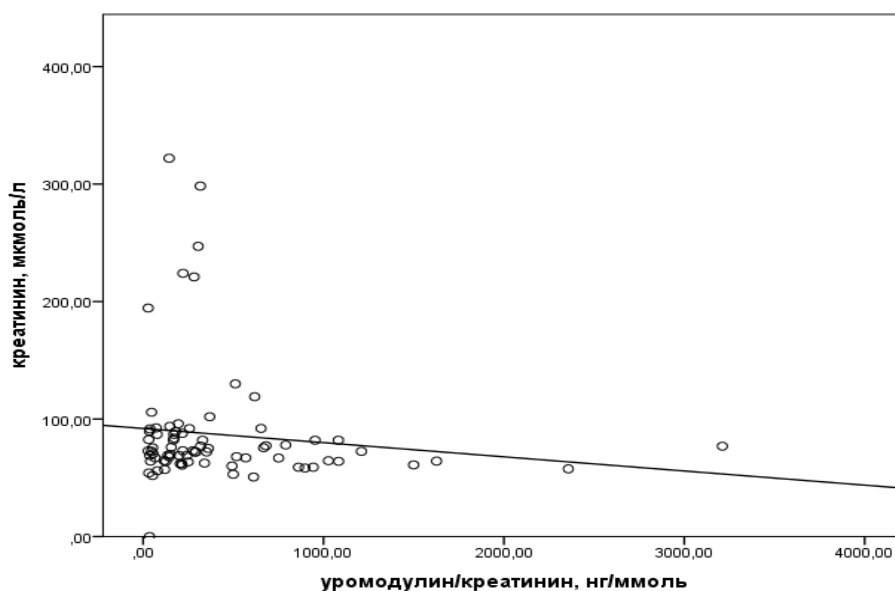


Рис. 13. Корреляция уромодулина с уровнем креатинина крови, мкмоль/л.

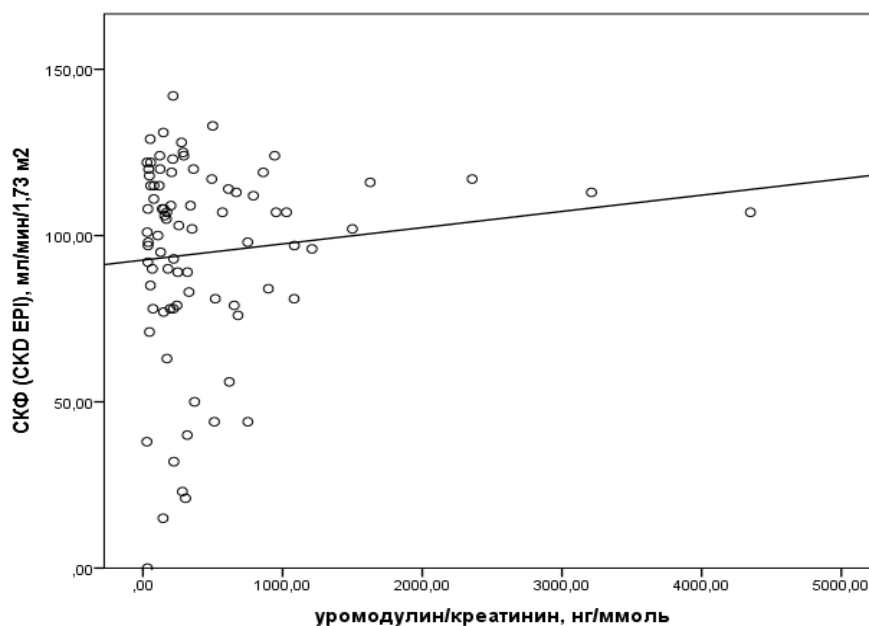


Рис. 14. Корреляция уромодулина с уровнем СКФ, мл/мин/1,73 м².

Мочевая экскреция цистатина С в группе А1 достоверно превышала показатели экскреции у здорового контроля и прогрессировала по мере увеличения АУ, (рис. 15).

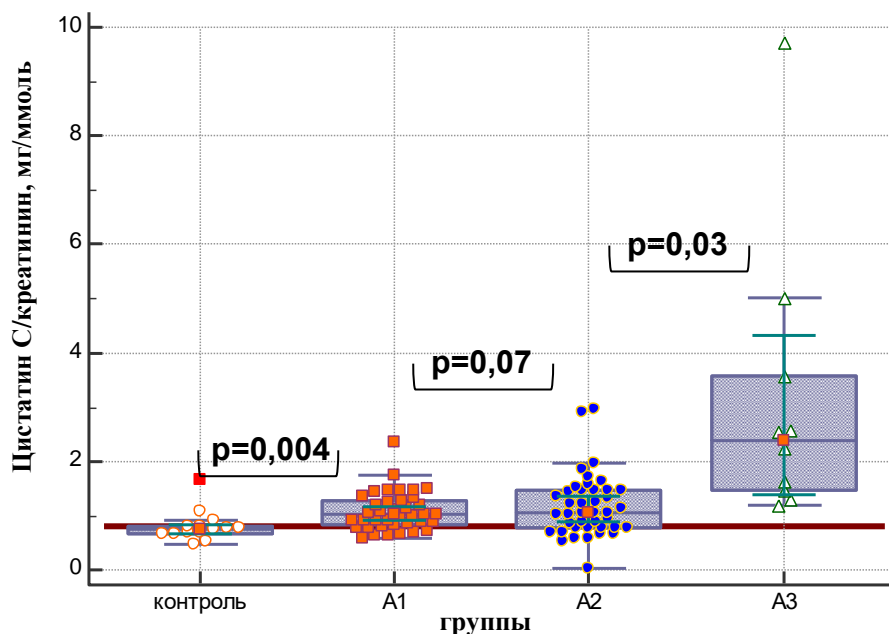


Рис. 15. Цистатин С/креатинин в моче, мг/ммоль.

Установлена прямая взаимосвязь мочевой концентрации цистатина С с длительностью заболевания ($r=0,41$, $p=0,009$) и отрицательная корреляционная взаимосвязь с уровнем СКФ ($r= - 0,45$, $p=0,01$), (рис. 16,17).

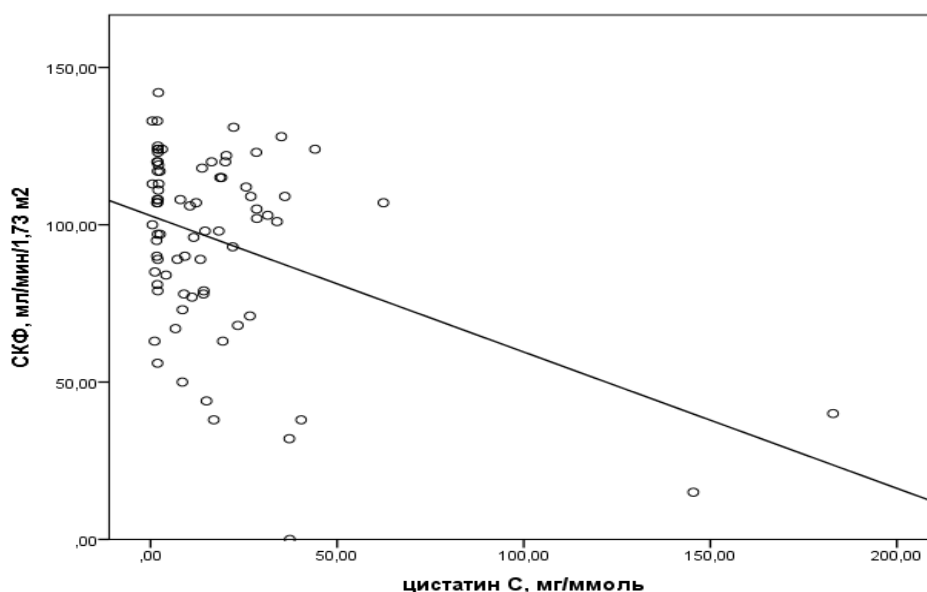


Рис. 16. Корреляция цистатина С в моче с уровнем СКФ, мл/мин/1,73 м².

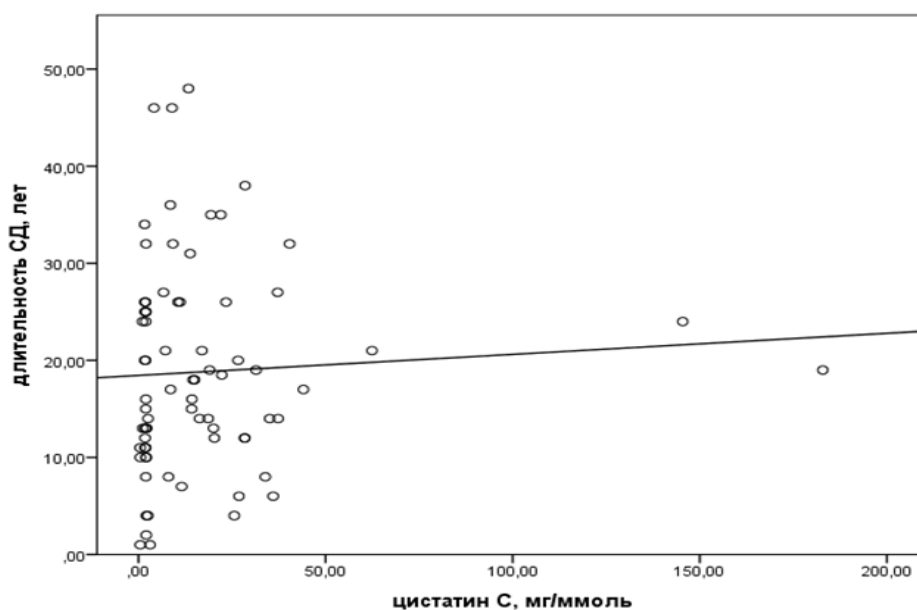


Рис. 17. Корреляция цистатина С в моче с длительностью СД, лет.

Маркер тубулярной дисфункции NGAL был выше во всех группах СД при сравнении с группой здорового контроля (0,75 [0,22; 0,97]), увеличиваясь по мере прогрессирования АУ ($p=0,009$). Однако, повышение уровня NGAL в группе А1 (1,19 [0,51; 1,93]) не имело статистических различий и было

максимальным в группах А2 (1,74 [1,31; 2,18]) и А3 (3,19 [2,37; 15,10]) при сравнении со здоровым контролем, (рис. 18).

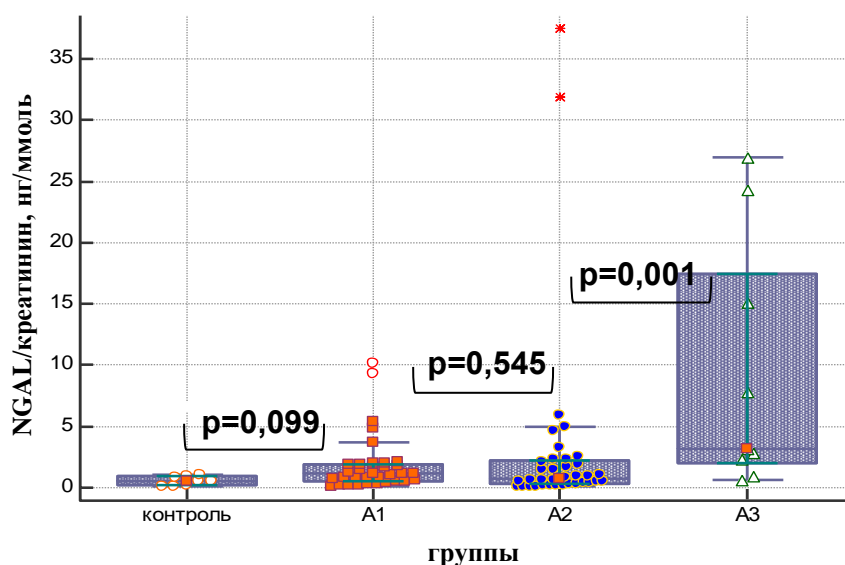


Рис. 18. NGAL/креатинин в моче, нг/ммоль.

В уровне биомаркера KIM-1 также не было выявлено значимых различий между группами здорового контроля (80,15 [60,69; 183,14]) и группой А1 (94,92 [57,52; 166,32]), (рис. 19). В то время как группа больных СД достоверно отличалась от группы здорового контроля ($p=0,035$).

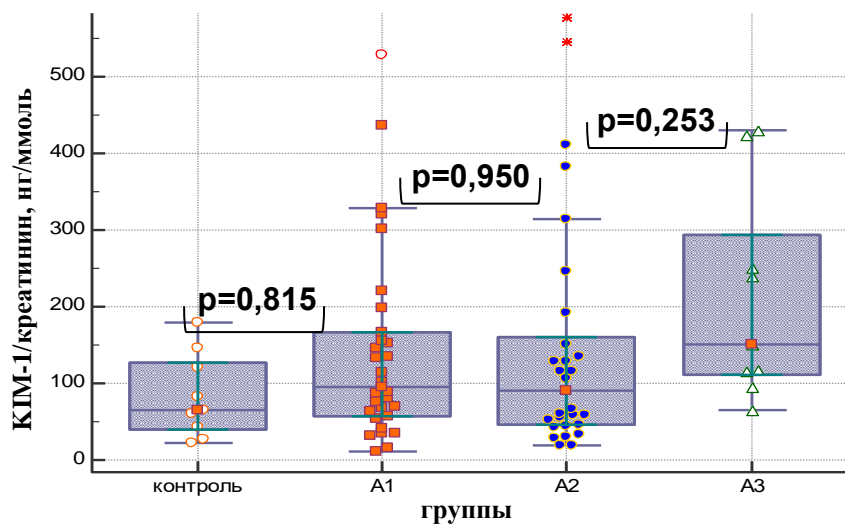


Рис. 19. KIM-1/креатинин в моче, нг/ммоль

3.1.2. Плазменные биомаркеры.

Выявлено достоверное повышение уровня остеопонтин в плазме крови уже на стадии А1 (79,45 [67,61; 122,70]) по сравнению с группой здорового контроля (58,88 [53,85; 75,29]), прогрессивно нарастающее у пациентов с более выраженным поражением почек, (рис. 20).

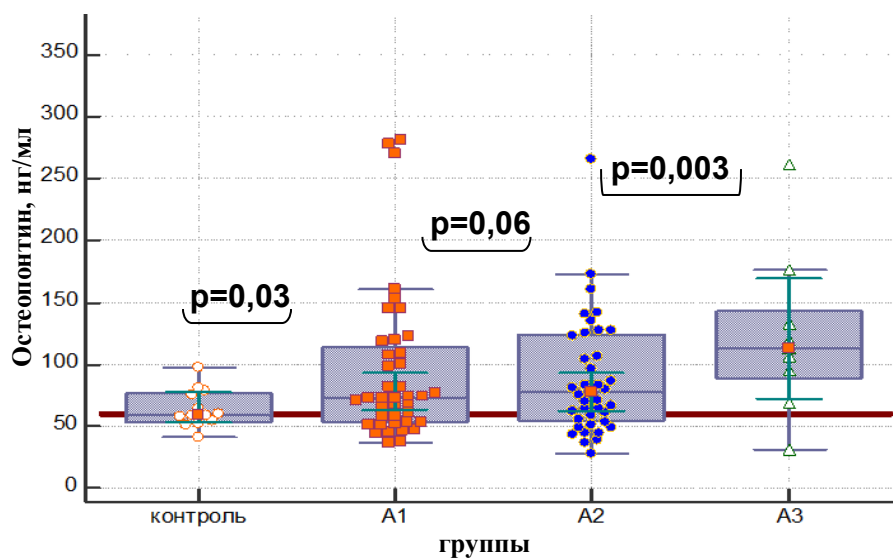


Рис. 20. Остеопонтин, нг/мл плазмы крови.

Установлена прямая взаимосвязь между уровнем остеопонтин и креатинином крови ($r=0,25$, $p=0,01$), (рис. 21).

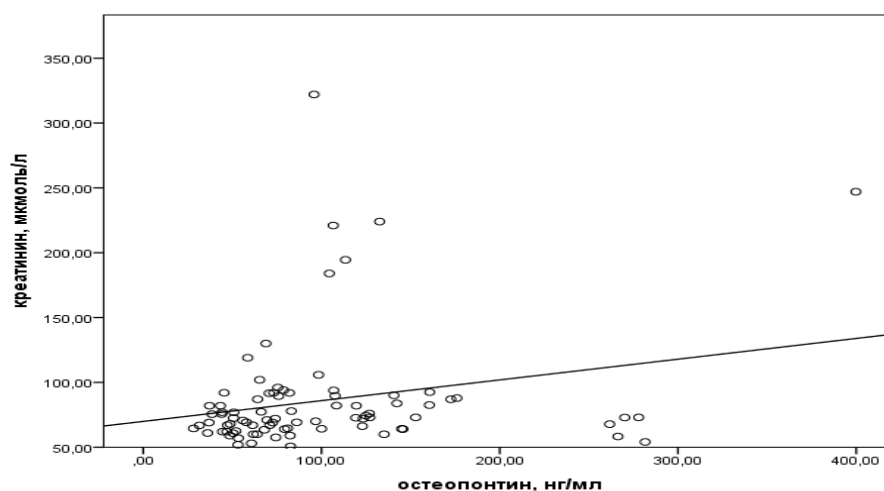


Рис. 21. Корреляция остеопонтин плазмы с уровнем креатинина крови, мкмоль/л.

По уровню цистатина С были получены достоверные различия у пациентов с СД в группе А1 и группы здорового контроля, (рис. 22).

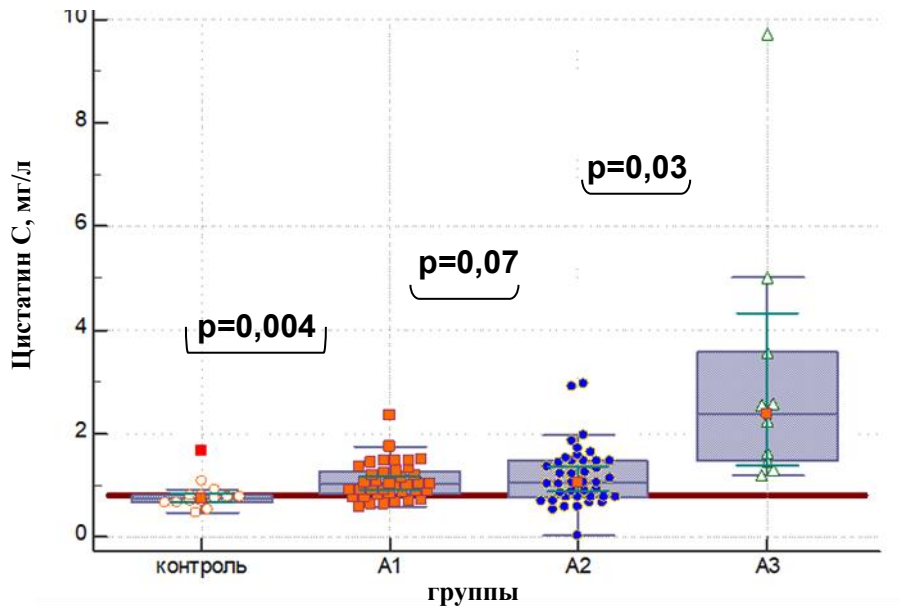


Рис. 22. Цистатин С, мг/л плазмы крови.

Установлена прямая корреляционная взаимосвязь между концентрацией цистатина С и креатинином крови ($r=0,50$, $p < 0,001$), обратная взаимосвязь с уровнем СКФ ($r = - 0,50$, $p < 0,001$), (рис. 23).

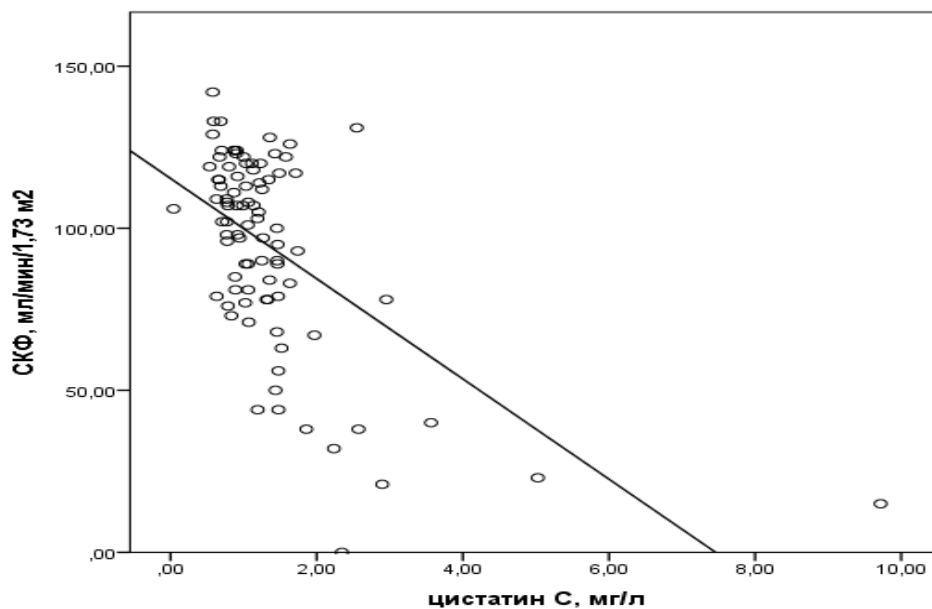


Рис. 23. Корреляция цистатина С плазмы с уровнем СКФ, мл/мин/1,73 м².

Выявлено достоверное повышение уровня NGAL в плазме крови у пациентов с СД на стадии А2 и А3 при сравнении с группой здорового контроля, однако в группе А1 уровень данного биомаркера статистически не отличался от показателей в группе контроля (рис. 24).

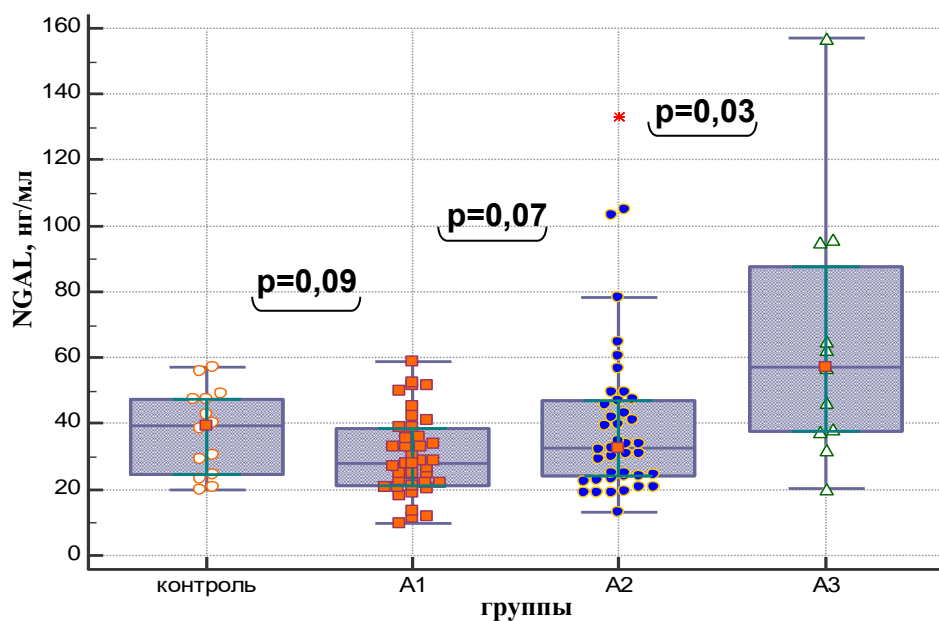


Рис. 24. NGAL, нг/мл плазмы крови.

При анализе уровня KIM-1 в плазме крови достоверных меж- и внутригрупповых различий выявлено не было (рис. 25).

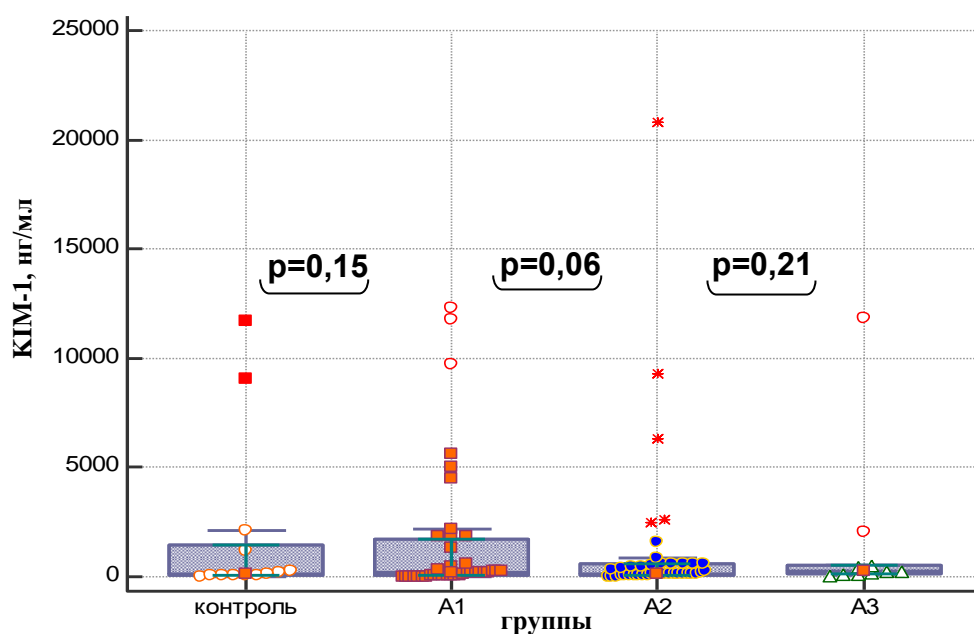


Рис. 25 KIM-1, нг/мл плазмы крови.

Заключение.

Таким образом, на первом этапе достоверные различия между группами здорового контроля и больными СД на стадии А1 были выявлены для 4 биомаркеров: нефрин, подоцин, коллаген 4 типа, уромодулин. Среди плазменных биомаркеров достоверные различия были получены для цистатина С и остеопонтин

3.1.3. Диагностическая значимость исследуемых биомаркеров.

Для оценки диагностической точности выполнен сравнительный анализ площадей под характеристическими кривыми (ROC AUC) исследуемых биомаркеров и АУ, показавший наилучшие значения чувствительности и специфичности для следующих мочевых биомаркеров: нефрин/креатинин, подоцин/креатинин, (рис. 26, 27).

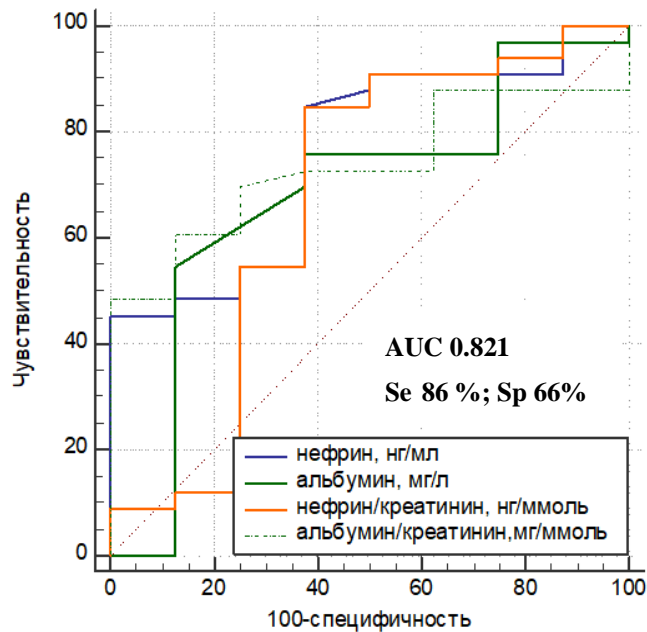


Рис. 26. ROC AUC Нефрин в моче.

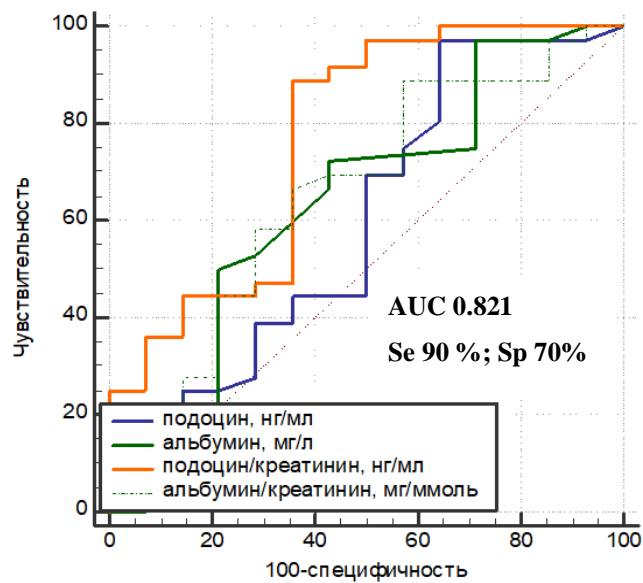


Рис. 27. ROC AUC Подоцин в моче.

Значения площади под кривой для мочевых биомаркеров коллагена IV типа и уромодулина, а также показатели чувствительности и специфичности были значимо ниже при сравнении со значениями АУ, (рис. 28,29).

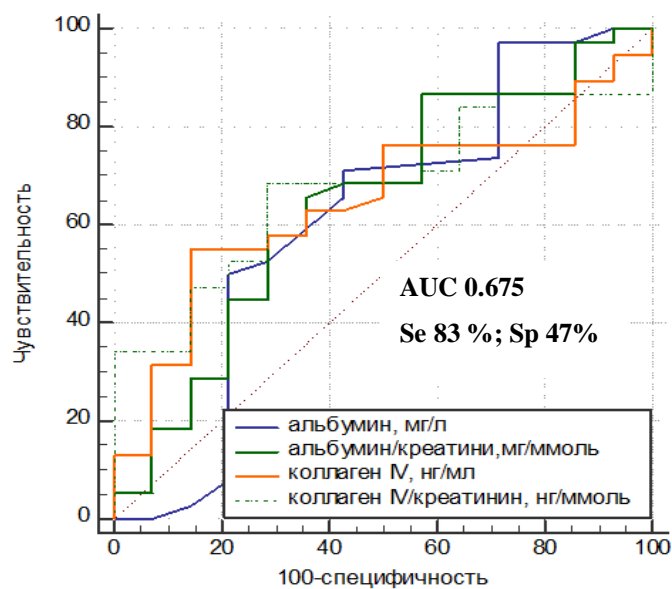


Рис. 28. ROC AUC Коллаген IV типа в моче.

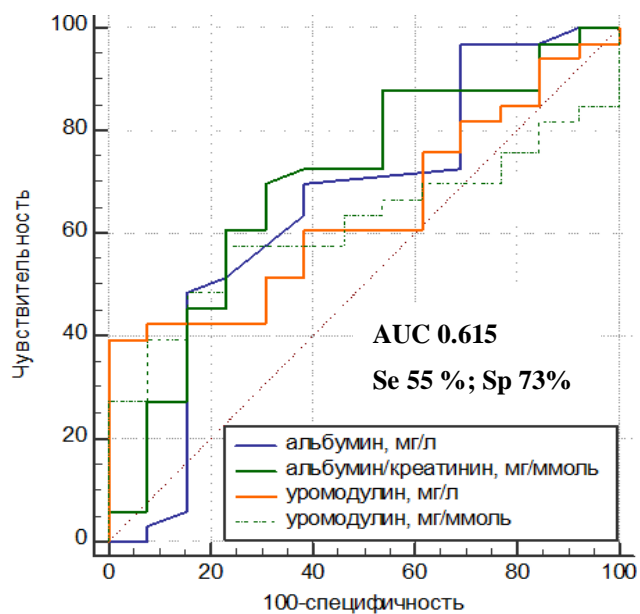


Рис. 29. ROC AUC уромодулин в моче.

Наибольшие значения чувствительности и специфичности среди плазменных биомаркеров были получены для остеопонтинина и цистатина С, (рис. 30,31).

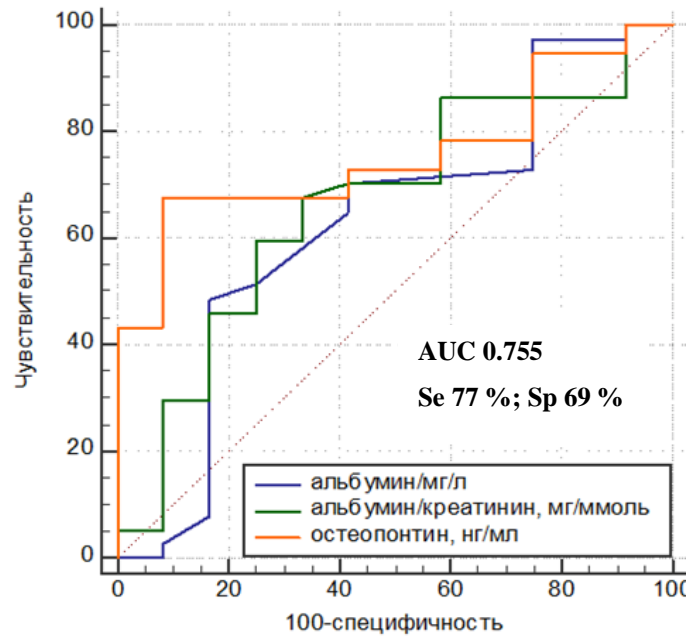


Рис. 30. ROC AUC Остеопонтин плазмы.

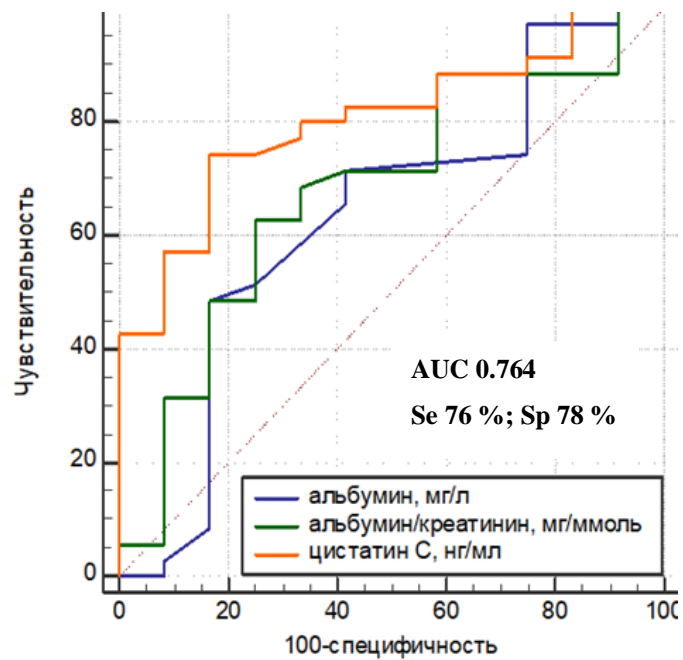


Рис. 31. ROC AUC Цистатин С плазмы.

Для маркеров, показавших наибольшие значения чувствительности и специфичности, были вычислены оптимальные значения порога отсечения в соответствии с наибольшим значением индекса Юдена (табл. 4).

Таблица 4. Оптимальные значения cut-off биомаркеров.

Биомаркер	cut-off	чувствительность	специфичность	Индекс Юдена
Нефрин, нг/мл (моча)	>0,06	81,58	66,67	0,482
Нефрин/креатинин, нг/ммоль (моча)	>0,006	86,11	66,67	0,523
Подоцин, нг/мл (моча)	>0,034	97,62	47,06	0,446
Подоцин/креатинин, нг/ммоль (моча)	>0,009	90,00	70,59	0,605
Цистатин С, мг/л (плазма)	>0,806	76,3	78,5	0,548
Остеопонтин, нг/мл (плазма)	>64,46	77,5	69,23	0,467

Таким образом, определена оптимальная панель биомаркеров (нефрин, подоцин, цистатин С, остеопонтин) для доклинической диагностики ДН, повышавшаяся у 40,4 % пациентов с СД 1 типа уже на стадии А1, рис. 30).

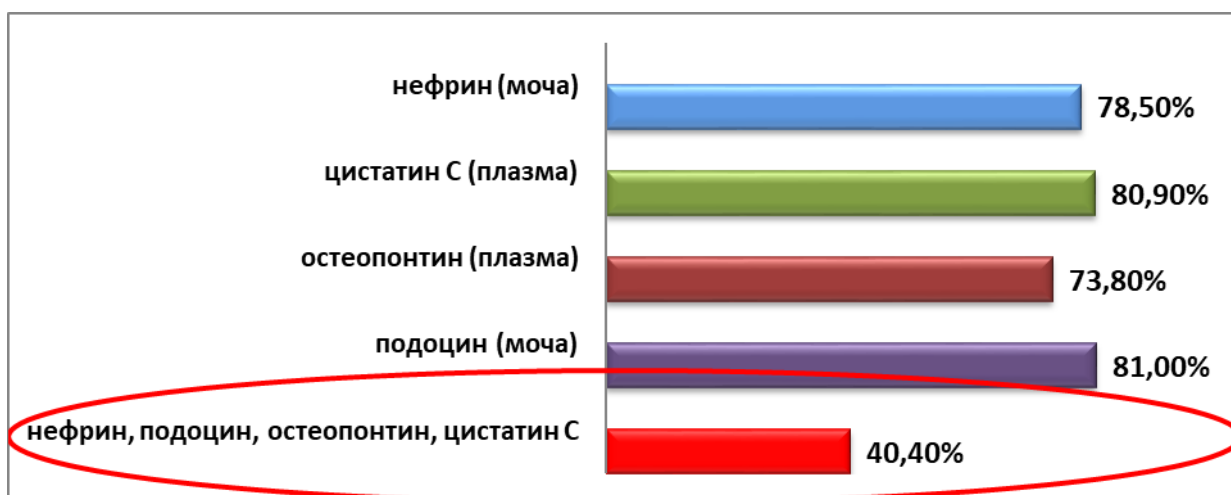


Рис. 32. Панель биомаркеров ранней диагностики ДН.

3.2. Проспективное исследование: оценка нефропротективных эффектов терапии а-рГПП-1.

Исходные характеристики пациентов представлены в табл. 4.1. На момент включения в исследование все пациенты были сопоставимы по основным клиническим и лабораторным параметрам.

Желудочно-кишечные расстройства (тошнота, диарея, рвота) были самыми распространенными неспецифическими явлениями за время исследования, наиболее часто возникали в период начала терапии и проходили через 2-3 недели после начала лечения. Назначение препарата в режиме постепенного повышения дозы приводило к облегчению диспепсических расстройств. За все время исследования никаких серьезных нежелательных побочных явлений (тяжелая гипогликемия/панкреатит/снижение СКФ) зафиксировано не было. Все пациенты, включенные в исследование, завершили протокол.

Через 6 месяцев терапии уровень HbA1c, индекс массы тела, показатели артериального давления между группами не различались (табл. 5). В показателях фильтрационной функции почек (креатинин, СКФ СКД EPI) и АУ в каждой из групп и между группами до и после терапии также не было выявлено достоверных различий (табл. 4.1).

Таблица 5. Клиническая характеристика пациентов до и через 6 мес. терапии.

Параметр	Группа инсулина (n=15)	Группа а-рГПП-1 +инсулин (n=12)	Межгрупповые различия p (Манн-Уитни)
ИМТ, кг/м²			
исходные данные	23 [21; 26]	27,5 [21; 38]	0,30
через 6 месяцев	23 [21; 26]	25,5 [21; 34]	0,85
p (Вилкоксон)	0,89	0,74	

Систолическое АД, мм рт.ст.			
исходные данные	120 [105; 130]	120 [110; 135]	0,47
через 6 месяцев	125 [112; 132]	120 [110; 128]	0,66
р (Вилкоксон)	0,80	0,90	
Диастолическое АД, мм рт.ст.			
исходные данные	70 [70; 85]	80 [70; 90]	0,38
через 6 месяцев	80 [70; 82]	80 [75; 85]	0,88
р (Вилкоксон)	0,79	0,94	
Гликированный гемоглобин (HbA1c), %			
исходные данные	7,5 [6,9; 8,6]	7,9 [7,4; 8,6]	0,30
через 6 месяцев	7,6 [6,9; 9,1]	7,2 [6,9; 7,8]	0,32
р (Вилкоксон)	0,78	0,07	
Креатинин, мкмоль/л			
исходные данные	75,2 [69; 91,9]	73 [66,2; 99,0]	0,51
через 6 месяцев	74,4 [74,0; 89,0]	82,0 [71,9; 89,0]	0,75
р (Вилкоксон)	0,62	0,61	
СКФ (СКД EPI), мл/мин/1,73 м²			
исходные данные	98 [89,2; 109,0]	106 [97,3; 107,2]	0,47
через 6 месяцев	96,5 [83,5; 115]	102 [98,0; 110,0]	0,36
р (Вилкоксон)	0,87	0,74	
Мочевая кислота, мкмоль/л			
исходные данные	324 [278; 373]	300 [274; 324]	0,54
через 6 месяцев	304 [278; 488]	271 [251; 294]	0,05
р (Вилкоксон)	0,51	0,05	
Холестерин, ммоль/л			
исходные данные	4,2 [3,9; 5,0]	4,5 [4,1; 5,0]	0,46
через 6 месяцев	4,6 [4,0; 5,0]	4,3 [4,1; 4,8]	0,62
р (Вилкоксон)	0,50	0,62	
Альбумин в моче, мг/л			
исходные данные	8,5 [5,0; 31,0]	8,0 [5,0; 36,0]	0,27
через 6 месяцев	11,0 [6,0; 39,0]	10,0 [6,0; 36,0]	0,06
р (Вилкоксон)	0,09	0,08	

* Выборочные параметры представлены как медианы, 25-й и 75-й процентиля, n - объем анализируемой подгруппы, р - достигнутый уровень значимости. Статистически значимым принимался уровень $p < 0,05$.

Анализ уровня мочевых биомаркеров до и после терапии выявил следующие статистически значимые различия: уровень экскреции нефрина после терапии достоверно снижался в группе а-рГПП-1+инсулин, однако межгрупповые различия не достигли статистической значимости ($p=0,05$). Различий в уровне экскреции подоцина ($p=0,06$) выявлено не было (табл. 6).

Таблица 6. Динамика мочевых биомаркеров до и через 6 месяцев терапии.

Параметр	Группа инсулина (n=15)	Группа а-рГПП-1+инсулин (n=12)	Межгрупповые различия p (Манн-Уитни)
Подоцин/креатинин, нг/ммоль (моча)			
исходные данные	0,27 [0,18; 0,44]	0,31 [0,21; 0,56]	0,26
через 6 месяцев	0,44 [0,19; 0,90]	0,16 [0,11; 0,70]	0,06
p (Вилкоксон)	0,32	0,05	
Нефрин/креатинин, нг/ммоль (моча)			
исходные данные	0,13 [0,09; 0,15]	0,22 [0,19; 0,39]	0,59
через 6 месяцев	0,11 [0,09; 0,15]	0,09 [0,02; 0,0,7]	0,05
p (Вилкоксон)	0,83	0,02	
Цистатин С, мг/л (плазма)			
исходные данные	1,27 [0,76; 1,46]	1,18 [0,78; 1,35]	0,66
через 6 месяцев	0,99 [0,95; 1,05]	0,27 [0,19; 0,81]	0,01
p (Вилкоксон)	0,71	0,02	
Остеопонтин, нг/мл (плазма)			
исходные данные	113,92 [75,50;161,54]	126,89 [45,38; 161,54]	0,69
через 6 месяцев	98,89 [74,16; 112,70]	38,20 [32,30; 41,23]	<0,001
p (Вилкоксон)	0,56	0,02	

* Выборочные параметры представлены как медианы, 25-й и 75-й процентиля, n - объем анализируемой подгруппы, p - достигнутый уровень значимости. Статистически значимым принимался уровень $p < 0,05$.

В уровне биомаркеров плазмы крови отмечалось достоверное снижение NGAL ($p=0,03$), остеопонтинина ($p<0,001$) и цистатина С ($p=0,01$) в группе а-рГПП-1 (табл. 4.3). При проведении корреляционного анализа статистически значимой взаимосвязи между уровнем биомаркеров и показателями метаболической компенсации (гликированный гемоглобин, липиды) получено не было.

Таким образом, добавление к инсулинотерапии а-рГПП-1 (1,2 мг/сут.) в течение 6 месяцев у больных СД 1 типа с нормальной АУ привело к изменению уровня ранних биохимических маркеров ДН и не повлияло на уровень стандартных показателей ДН – СКФ, АУ, а также показатели углеводного обмена (HbA1c). Выявленные изменения уровня биомаркеров ДН не зависели от степени компенсации углеводного обмена, что свидетельствует о плеiotропном действии аГПП-1 на функцию почек.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.

Наше исследование показало, что стадия ДН А1 характеризуется патологическими изменениями уровня ряда гломерулярных и тубулоинтерстициальных биомаркеров, показавших высокую чувствительность и специфичность в диагностике ДН.

4.1. Биомаркеры клубочкового поражения.

В нашей работе повышенная мочевая экскреция подоцина и нефрина определялась уже на стадии А1 и достоверно превышала показатели экскреции у здорового контроля, в то время как у пациентов из группы А3 отмечалось снижение уровня нефрина и подоцина по сравнению с предшествующими стадиями ДН и группой здорового контроля. Снижение экскреции данных маркеров на стадии А3 может быть следствием прогрессирующей подоцитопении вследствие большего повреждения почечного фильтра, когда ведущим признаком ДН становится АУ. Повышение уровня нефрина и подоцина на стадии А1 отмечалось у 69 и 80 % пациентов, соответственно, и коррелировало с уровнем АУ и СКФ. Гипергликемия и другие патологические изменения при СД (АД, дислипидемия) инициируют структурные нарушения клубочкового аппарата, потерю нефрина и интегрин, реорганизацию актинового цитоскелета, что приводит к слущиванию и стиранию ножек подоцитов, подоцитопении, и, как следствие, к повышению проницаемости почечного фильтра и увеличению экскреции подоцитов. [Diez-sampedro, Lenz, Fornoni, 2011] Оголенные пространства в базальной мембране клубочка (БМК) формируют синехии с капсулой Боумана, что запускает развитие гломерулосклероза и последующее ухудшение функции почек. [Skoberne, Konieczny, Schiffer, 2009] Таким образом, повышение экскреции подоцитспецифичных белков может быть наиболее ранним признаком начальной ДН. Так, в исследовании Patagi нефринурия была

выявлена не только у 28 % больных с впервые выявленной МАУ, но и у 30 % больных СД 1 типа с нормоальбинурией (НАУ). [Patari и др., 2003] Данные морфологического исследования почечных биоптатов показали стирание ножек (отслоение) подоцитов и прогрессирующее уменьшение фенестрации эпителия у пациентов с СД 1 типа с различными стадиями ДН [Weil и др., 2012] [Toyoda и др., 2007]. Данные литературы противоречивы. Так по данным исследования Nakamura у пациентов с СД 2 типа повышенная экскреция с мочой маркеров подоцитопатии отмечалась у 53 % с МАУ и 80 % пациентов на стадии ПУ, в то время как в группе здорового контроля и НАУ экскреция была в норме. [Nakamura и др., 2000]

В нашей работе как мочевая экскреция цистатина С, так и его плазменный уровень были значимо выше у пациентов в группе А1 и коррелировали с основными клинико-лабораторными маркерами - длительностью заболевания, уровнем креатинина и СКФ. Цистатин С – низкомолекулярный протеин, который свободно фильтруется в клубочках, полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах, и может рассматриваться в качестве маркера как канальцевого, так и клубочкового поражения [Krolewski и др., 2012]

Коллаген IV типа представляет собой высокомолекулярный протеин, являющийся основным компонентом БМК, канальцев, а также мезангиального матрикса. Большая молекулярная масса коллагена IV типа препятствует его свободной фильтрации через БМК в норме. В экспериментальных работах на модели СД у мышей показано, что аккумуляция коллагена IV типа в мезангии почек наблюдается на очень ранних стадиях ДН и даже предшествует развитию таких классических проявлений начальной гломерулопатии, как гипертрофия клубочков и гиперфильтрация. [Бондарь и др., 2011] В ряде исследований выявлено увеличение содержания коллагена IV типа в моче у пациентов с СД по сравнению с группой контроля [Sthaneshwar и др. 2010], при этом установлено, что повышение его экскреции указывает на высокий

риск последующего снижения фильтрационной функции почек. В нескольких работах показано, что уровень мочевой экскреции коллагена IV типа постепенно увеличивается по мере прогрессирования ДН. [Sthaneshwar, Chan, 2010], [Cawood и др., 2010] Так, по данным исследования Cawood, повышение экскреции коллагена IV типа выявлялось у 26% пациентов с НАУ, у 58% – с МАУ и у 65%, с макроальбинурией. [Cawood и др., 2010] Результаты, полученные в нашей работе показали, что мочевая экскреция коллагена IV типа прогрессивно нарастала по мере увеличения тяжести ДН. Достоверно более высокие показатели коллагенурии были зафиксированы у больных уже на стадии А1 в сравнении группой здорового контроля. Выявленные изменения могут отражать нарушение процессов матричного синтеза и деградации, связанных с его избыточной продукцией наряду с повышением активности матричных металлопротеиназ, вызывающим отложение коллагена в БМК, повышением проницаемости почечного фильтра и увеличением экскреции коллагена.

4.2. Биомаркеры тубулоинтерстициального поражения.

Как известно, характерным структурным нарушением при ДН является поражение клубочков и межклеточной ткани с накоплением межклеточного матрикса и формированием гломерулярного фиброза – сложного процесса, в который вовлечены многие молекулы и клетки. Однако по-прежнему дискутируется вклад различных структур в последовательность патологических изменений в почках при СД. Ряд авторов предполагают, что тубулопатия предшествует поражению клубочков и является более ранним признаком диабетического поражения почек, приводя к компенсаторному увеличению тубулярной массы, размеров и массы почек. [Zeni и др., 2017]

По результатам нашего исследования плазменная концентрация остеопонтина - фосфогликопротеина, экспрессируемого в петле Генле и

дистальных канальцах, достоверно повышалась уже на стадии А1, прогрессивно увеличивалась у пациентов на стадиях А2 и А3 и коррелировала с уровнем креатинина. Поскольку остеопонтин относится к семейству цитокинов, также как и ряд других цитокиновых систем, он играет важную роль в процессах тубулоинтерстициального поражения почек, обеспечивая процессы клеточной адгезии и миграции, а также ремоделирование актинового цитоскелета в подоцитах. Повышение уровня остеопонтин может отражать тяжесть интерстициального фиброза. Результаты ряда экспериментальных работ продемонстрировали значимое повышение экспрессии остеопонтин в условиях гипергликемии в гладкомышечных и мезангиальных клетках, указывая на непосредственное участие этого гликопротеина в патогенезе диабетического поражения почек. [Panduru и др., 2014]

Уромодулин – гликопротеин, секретирующийся в клетках петли Генле, у здоровых лиц в больших количествах выделяется с мочой. Установлено, что при гипергликемии отложение депозитов гликогена, в том числе в ткани почек, приводит к снижению экспрессии уромодулина при ДН. [Lou и др., 2017] Предполагается роль этого белка в качестве маркера повреждения дистальных канальцев, отражающего количество интактных клеток и реальную почечную массу в большей степени, чем СКФ.

По результатам нашего исследования мочевого концентрация уромодулина была достоверно ниже у пациентов с СД уже на стадии А1 до развития МАУ в сравнении со здоровым контролем, и по мере увеличения степени АУ уровень экскреции уромодулина продолжал снижаться, наиболее низкие показатели были выявлены в группе А3. Уровень экскреции маркера достоверно коррелировал с показателями почечной функции – уровнем креатинина и СКФ. По данным литературы, у 20 % больных СД 1 типа отмечалось персистирующее снижение уровня уромодулина в течение первых

лет после манифестации заболевания. [Lou и др., 2017] В ряде исследований была показана потенциальная связь сниженной экскреции пептида со снижением СКФ. [Rampoldi и др., 2011] Можно предположить, что раннее вовлечение канальцев в патогенез ДН на доклинических стадиях может быть обусловлено развитием гиперфльтрации, а также тубулотоксичным эффектом конечных продуктов гликирования. [Tang, Leung, Neng, 2011]

Повышение как плазменной, так и мочевой концентрации NGAL в нашем исследовании отмечалось преимущественно на поздних стадиях ДН (А2 и А3). В то время как достоверных различий между группами здорового контроля и больными СД на стадии А1 получено не было, как и в отношении другого острофазового маркера KIM-1, секретируемого клетками проксимальных канальцев. Известно, что NGAL является низкомолекулярным протеином, отражающим массу действующих канальцев. Поскольку экспрессия протеина повышается в первые часы после патологического воздействия, он рассматривается в качестве чувствительного маркера острого почечного повреждения. Так, по данным клинических исследований у пациентов с СД 2 типа были выявлены повышенные уровни NGAL и KIM-1 в сыворотке и моче, коррелировавшие с тяжестью поражения почек. [Nielsen и др., 2010], [Yin, Wang, 2016]

Таким образом, в нашем исследовании маркеры, характеризующие в большей степени острофазовое повреждение почек, не показали достоверных изменений на начальных стадиях ДН, что может указывать на их меньшую роль в диагностике диабетического повреждения, которое носит хронический характер.

4.3. Оценка нефропротективных эффектов терапии а-рГПП-1.

В проспективной части работы по оценке влияния терапии аГПП-1 на функцию почек получены достоверные различия в уровне ряда наиболее чувствительных и ранних биомаркеров поражения почек.

Так, в нашем исследовании, были получены данные о снижении экскреции уровня коллагена IV типа – маркера гломерулосклероза, что может быть обусловлено уменьшением тканевого воспаления и экспансии мезангиальной ткани. Установлено, что ранние морфологические изменения, характерные для ДН, опосредуются дефицитом рГПП-1, что было продемонстрировано на модели СД у мышей с knockout-мутацией гена *pГПП-1* (-/-рГПП). У таких животных отмечалось более выраженное увеличение мезангиального матрикса и содержания фибронектина в стенке капилляров, снижение количества подоцитов и увеличение толщины БМК по сравнению с обычной линией мышей с СД [Ishibashi и др., 2011] В свою очередь, введение животным аГПП-1 приводило к подавлению образования АФК в мезангиальных клетках, значимому снижению клубочковой гипертрофии и мезангиальной экспансии матрикса за счет уменьшения аккумуляции коллагена IV типа. Данные эффекты терапии а-рГПП-1 также подтверждаются экспериментальными исследованиями, показавшими снижение выработки провоспалительных цитокинов и молекул межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) в культуре клеток мезангия, что приводило к улучшению клинических и морфологических эквивалентов поражения почек (выраженности гломерулярного склероза) [Chang и др., 2017], [Mima и др., 2012], [Zhang и др., 2012] Предполагается, что протективный эффект а-рГПП-1 в отношении функции почек обусловлен уменьшением оксидативного стресса и воспаления. [Hoher, Reichetzeder, Alter, 2012], [Hendarto и др., 2012]

Одним из главных факторов прогрессирования дегенеративных изменений в клубочках при ДН является внутриклубочковая гипертензия, ведущая к реорганизации актинового цитоскелета подоцитов, очень

чувствительных к механическому растяжению [Mundel, 2017] Было показано, что содержание остеопонтина, ответственного за резистентность подоцитов к растяжению, повышается при СД. [Panduru и др., 2014] Применение а-рГПП-1 в нашем исследовании сопровождалось уменьшением в моче уровня не только остеопонтина, но и нефрина – одного из ранних маркеров повреждения подоцитарного аппарата.

Кроме того, применение а-рГПП-1 у пациентов с СД сопровождалось снижением содержания в плазме крови уровня островоспалительного энзима NGAL, а также высокочувствительного маркера клубочковой фильтрации цистатина С, что может отражать положительное влияние терапии непосредственно на функциональное состояние почек. В нашем исследовании получены данные о повышении экскреции уромодулина в группе лираглутида, что может свидетельствовать о нефропротективном эффекте а-рГПП-1.

Нефропротективные свойства терапии а-рГПП-1 также подтверждены в крупном международном исследовании LEADER (Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results), одной из конечных точек которого являлась оценка влияния а-рГПП-1 лираглутида на микрососудистые исходы у пациентов с СД 2-го типа. Исследование показало снижение частоты развития комбинированной точки почечных исходов: развития МАУ, удвоения уровня креатинина, ТПН или ренальной смерти в группе лираглутида (1,5 против 1,9 случая на 100 пациенто-лет наблюдения, относительный риск 0,78; 95% ДИ 0,67–0,92; $p=0,003$). Отсутствие значимых различий в уровне HbA1c между исследуемыми группами позволяет предполагать наличие у а-рГПП-1 прямого нефропротективного действия, независимого от его сахароснижающего эффекта. [Marso и др., 2016]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Доклиническая диагностика ДН, а значит, возможность своевременного назначения патогенетической терапии и замедления прогрессирования диабетического повреждения почек, является чрезвычайно актуальной проблемой. Во всем мире ведется поиск лабораторных маркеров, позволяющих выявлять ДН на самых ранних стадиях, когда изменения в почках потенциально обратимы. Полученные изменения в уровне гломерулярных и тубулоинтерстициальных биомаркеров (подоцин, нефрин в моче, цистатин С, остеопонтин в плазме крови), определяемые на стадии А1 и, коррелирующие с уровнем СКФ, открывают несомненные перспективы для их использования в качестве доклинической панели диагностики этого тяжелого и прогрессирующего осложнения.

Полученные данные о динамике уровня высокочувствительных ренальных биомаркеров свидетельствуют о нефропротективном эффекте а-рГПП-1 у пациентов с СД 1-го типа с нормо- и микроальбуминурией при добавлении лираглутида к инсулинотерапии, что открывает дополнительные перспективы нефропротективного действия сахароснижающей терапии. В качестве механизма нефропротекции, опосредованной ГПП-1, можно предполагать увеличение количества рГПП-1 в ткани почек, противовоспалительный и антиоксидативный эффекты.

Для оценки долгосрочных эффектов, в том числе на показатели фильтрационной функции и структурные изменения ткани почек, требуется проведение дополнительных клинических исследований.

ВЫВОДЫ.

1. Оценка комплекса биомаркеров гломерулярного и тубулоинтерстициального повреждения почек у пациентов с СД 1 типа на различных стадиях ДН выявила преимущественное изменение в уровне гломерулярных биомаркеров при меньшем изменении тубулоинтерстициальных биомаркеров: повышение мочевого экскреции гломерулярных (нефрин, подоцин, коллаген IV типа) и тубулоинтерстициальных (цистатин С) биомаркеров, снижение мочевого экскреции тубулоинтерстициального биомаркера уромодулина; в плазме крови повышение уровня гломерулярных биомаркеров остеопонтина и цистатина С. Данные изменения были выявлены до развития альбуминурии (А1), прогрессировали по мере утяжеления стадии ДН и коррелировали с уровнем альбуминурии, скоростью клубочковой фильтрации и не зависели от клинических (АД) и метаболических (гликированный гемоглобин) показателей.

2. Установлено, что нефрин (86 % чувствительность, 66 % специфичность, $AUC=0,821$), подоцин в моче (90 % чувствительность, 70 % специфичность, $AUC=0,821$), цистатин С (76 % чувствительность, 78 % специфичность, $AUC=0,764$) и остеопонтин в плазме (77 % чувствительность, 69 % специфичность, $AUC=0,755$) обладают большей чувствительностью и специфичностью по сравнению со стандартным исследованием микроальбуминурии, что указывает на их более высокую диагностическую значимость и позволяет рассматривать в качестве диагностической панели для раннего выявления ДН.

3. Комбинация наиболее чувствительных и специфичных биомаркеров: нефрин, подоцин в моче, остеопонтин, цистатин С в плазме наблюдалась у 40,4 % пациентов с СД 1 типа до развития микроальбуминурии

(A1). Рассчитаны пороговые диагностические значения исследуемых биомаркеров: нефрин $< 0,006$ нг/ммоль, подоцин $< 0,009$ нг/ммоль в моче, цистатин С $< 0,8$ мг/л, остеопонтин $< 64,4$ нг/мл в плазме.

4. У пациентов с СД 1 типа добавление к инсулинотерапии а-рГПП-1 (лираглутид) в дозе 1,2 мг/сут. в течение 6 месяцев приводит к нормализации патологических уровней биомаркеров ДН – снижению уровня нефрина и подоцина в моче, остеопонтинина и цистатина С в плазме, не связанных с достоверным улучшением гликемического контроля, что может свидетельствовать о положительном влиянии данного препарата на гломерулярные и тубулоинтерстициальные изменения в почках при СД 1 типа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

Предложена диагностическая панель биомаркеров (подоцин, нефрин в моче, остеопонтин, цистатин С в плазме), позволяющая диагностировать ранние изменения гломерулярного и тубулоинтерстициального аппарата почек уже на доальбуминурической стадии у больных СД 1 типа.

Положительное влияние а-рГПП-1 (лираглутид) на уровень экскреции и плазменную концентрацию ранних биохимических маркеров ДН указывает на возможное участие а-рГПП-1 в нефропротекции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АП - ангиотензин II
- АГ - артериальная гипертензия
- АД - артериальное давление
- аГПП-1 - агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1
- АПФ - ангиотензин-превращающий фермент
- АУ - альбуминурия
- АФК - активные формы кислорода
- БРА - блокаторы рецептора к ангиотензину
- ДАД - диастолическое артериальное давление
- ДИ - доверительный интервал
- ДН - диабетическая нефропатия
- ДР - диабетическая ретинопатия
- иАПФ - ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента
- ИБС - ишемическая болезнь сердца
- ИМТ - индекс массы тела
- ИФА - иммуноферментный анализ
- ЛПВП - липопротеиды высокой плотности
- ЛПНП - липопротеиды низкой плотности
- МАУ - микроальбуминурия
- НАД(Ф)Н - Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- ПКА - протеинкиназа А
- ПУ - протеинурия
- РААС - ренин-ангиотензин альдостероновая система
- САД - систолическое артериальное давление
- СД1 - сахарный диабет 1 типа
- СЖК - свободные жирные кислоты

- СКФ - скорость клубочковой фильтрации
- ТГ - триглицериды
- ТПН - терминальная почечная недостаточность
- ХБП - хроническая болезнь почек
- ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
- цАМФ - Циклический аденозинмонофосфат
- ЮГА - юкстагломерулярный аппарат
- СТGF - соединительнотканый фактор роста
- HbA1c - гликированный гемоглобин
- NGAL - липокалин ассоциированный с желатиназой нейтрофилов
- KIM- 1 - молекула почечного повреждения 1 типа
- TGF- β 1 - трансформирующий факто роста
- VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Бобкова, И. Н., Шестакова, М. В., Щукина, А. А. Повреждение подоцитов при сахарном диабете // Сахарный диабет. - 2014. - № 3. - С. 39–50.
2. Бондарь, И. А., Климонтов, В. В., Парфентьева, Е. М. Мочевая экскреция коллагена IV типа – ранний маркер фиброзирования почек при сахарном диабете // Сахарный диабет. - 2011. - №4. - С. 29–31.
3. Дедов, И. И., Шестакова, М. В., Викулова, О. К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета // Сахарный диабет. - 2017. - Т. 20. - № 1. - С. 13–41.
4. Лебедева, Н. О., Викулова, О. К. Маркеры доклинической диагностики диабетической нефропатии у пациентов с сахарным диабетом 1 типа // Сахарный диабет. - 2012. - № 2. - С. 38–45.
5. Шестакова, М. В., Викулова, О. К. Инновации в диагностике и лечении сахарного диабета 2 типа // Русский врач. - 2012. №8. - С. 2–6.
6. Abrahamson, M. et al. Structure and expression of the human cystatin C gene // Biochemical Journal. - 1990. - Vol. 268. - № 2. - P. 287–294.
7. Adler, A. et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64) on behalf of the UKPDS GROUP // Kidney International. - 2003. - Vol. 63. - № 1. - P. 225–232.
8. Afghahi, H. et al. Risk factors for the development of albuminuria and renal impairment in type 2 diabetes the Swedish National Diabetes Register (NDR) // Nephrology Dialysis Transplantation. - 2011. - Vol. 26. - № 4. - P. 1236–1243.
9. Al-Kafaji, G. et al. High glucose-induced oxidative stress increases the copy number of mitochondrial DNA in human mesangial cells. // BioMed research international. - 2013. - Vol. 2013. - P. 754946.
10. Alicic, R. et al. Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities // Clinical Journal of the American Society of Nephrology. - 2017. -

Vol.12. - № 12. - P.2032–2045.

11. Araki, S. et al. Association between urinary type IV collagen level and deterioration of renal function in type 2 diabetic patients without overt proteinuria // *Diabetes Care*. - 2010. - Vol. 33. - № 8. - P. 1805–1810.

12. Asanuma, K., Mundel, P. The role of podocytes in glomerular pathobiology // *Clinical and Experimental Nephrology*. - 2003. - Vol. 7. - № 4. - P. 255–259.

13. Baggio, L., Drucker, D. Biology of Incretins : GLP-1 and GIP // *Gastroenterology*. - 2007. - Vol. 132. - № 6 - P. 2131–2157.

14. Bailly, V. et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration // *Journal of Biological Chemistry*. - 2002. - Vol. 277. - № 42. - P. 39739–39748.

15. Banu, N. et al. 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 // *Diabetes Research and Clinical Practice*. - 1995. - Vol. 29. - № 1. - P. 57–67.

16. Barratt, J., Topham, P. Urine proteomics: The present and future of measuring urinary protein components in disease // *Cmaj*. - 2007. - Vol. 177. - № 4. - P. 361–368.

17. Bolignano, D. et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage // *American Journal of Kidney Diseases*. - 2008. - Vol. 52. - № 3. - P. 595–605.

18. Brito, P. et al. Proximal tubular basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. // *Kidney international*. - 1998. - Vol. 53. - № 3. - P. 754–61.

19. Campbell, R. Clarifying the role of incretin-based therapies in the treatment of type 2 diabetes mellitus // *Clinical Therapeutics*. - 2011. - Vol. 33. - № 5. - P. 511–527.

20. Caramori, M., Fioretto, P., Mauer, M. Enhancing the predictive value of

urinary albumin for diabetic nephropathy. // Journal of the American Society of Nephrology : JASN. - 2006. - Vol. 17. - № 2. - P. 339–52.

21. Cawood, T. et al. Urinary collagen IV and π GST: potential biomarkers for detecting localized kidney injury in diabetes-a pilot study. // American journal of nephrology. - 2010. - Vol. 32. - № 3. - P. 219–225.

22. Chang J.-T. et al. Glucagon-like peptide receptor agonists attenuate advanced glycation end products-induced inflammation in rat mesangial cells // BMC Pharmacology and Toxicology. - 2017. - Vol. 18. - № 1. - P. 67.

23. Cohen, M., Lautenslager, G., Shearman, C. Increased Collagen IV Excretion in Diabetes: A marker of compromised filtration function // Diabetes Care. - 2001. - Vol. 24. - № 5. - P. 914–918.

24. Cole, T. et al. Characterization of the receptor for glucagon-like insulinoma-derived cells by covalent cross-linking // Journal of molecular endocrinology. - 1988. - Vol. 2 - № 2. - P. 93-98.

25. Coll, E. et al. Serum cystatin C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment // American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation. - 2000. - Vol. 36. - № 1. - P. 29–34.

26. Coward, R. et al. nephrin is critical for the action of insulin on human // Diabetes. - 2007. - Vol. 56. - № 4. - P. 1127–1135.

27. Cybulsky, A. et al. Endoplasmic reticulum stress in glomerular epithelial cell injury // American journal of physiology. Renal physiology. - 2011. - Vol.301. - № 3. - P. 496–509.

28. Denhardt, D. et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: Regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival // Journal of Clinical Investigation. - 2001. - Vol. 107. - № 9. - P. 1055–1061.

29. Diez-sampedro, A., Lenz, O., Fornoni, A. In translation podocytopathy in diabetes : a metabolic and endocrine disorder podocyte biology and function histopathologic features of dn in humans include // American journal of kidney

diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. - 2011. - Vol. 58. - № 4. - P. 637–646.

30. Doublier, S. et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: Evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II // *Diabetes*. - 2003. - Vol. 52. - № 4. - P. 1023–1030.

31. Fioretto, P., Steffes, M., Mauer, M. Glomerular structure in nonproteinuric IDDM patients with various levels of albuminuria // *Diabetes*. - 1994. - Vol. 43. - P. 1358 - 1364.

32. Fu, W. et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: A cross-sectional study // *Endocrine*. - 2012. - Vol. 41. - № 1. - P. 82–88.

33. Fujita, H. et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential. // *Kidney international*. - 2014. - Vol. 85. - № 3. - P. 579–89.

34. Gandhi, R. et al. Accelerated receptor shedding inhibits kidney injury molecule-1 (KIM-1)-mediated efferocytosis // *American journal of physiology. Renal physiology*. - 2014. - Vol. 307. - № 2. - P. 205–221.

35. Gilbert, R., Cooper, M. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: More than an aftermath of glomerular injury? // *Kidney International*. - 1999. - Vol. 56. - № 5. - P. 1627–1637.

36. Gorin, Y. et al. Nox4 NAD (P) H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney // *The Journal of biological chemistry*. - 2005. - Vol. 280. - № 47. - P. 39616–39626.

37. Harris, R. et al. Global glomerular sclerosis and glomerular arteriolar hyalinosis in insulin dependent diabetes // *Pediatric Nephrology*. - 1992. - Vol. 6. - № 4. - P. 364.

38. Hartleben, B. et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice // *Journal of Clinical Investigation*. - 2010. - Vol. 120. - № 4. - P. 1084–1096.

39. Hendaro, H. et al. GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via protein kinase A-mediated inhibition of renal NAD(P)H oxidases // *Metabolism*. - 2012. - Vol. 61. - № 10. - P. 1422–1434.

40. Hocher, B., Reichetzedler, C., Alter, M. Renal and cardiac effects of DPP-4 inhibitors - from preclinical development to clinical research // *Kidney and Blood Pressure Research*. - 2012. - Vol. 36. - № 1. - P. 65–84.

41. Holmquist, P. et al. Early urinary changes in Tamm-Horsfall protein and epidermal growth factor in diabetic children // *Pediatric Nephrology*. - 2001. - Vol. 16. - № 6. - P. 488–492.

42. Holz, G. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell // *Diabetes*. - 2004. - Vol. 53. - № 1. - P. 5 - 13.

43. Huber, T. et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. // *Molecular and cellular biology*. - 2003. - Vol. 23. - № 14. - P. 4917–4928.

44. Ichimura, T. et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury // *Journal of Biological Chemistry*. - 1998. - Vol. 273. - № 7. - P. 4135–4142.

45. IDF Diabetes Atlas 7th edition. - 2015. - P. 1-163.

46. Iijima, T. et al. Follow-up study on urinary type IV collagen in patients with early stage diabetic nephropathy. // *Journal of clinical laboratory analysis*. - 1998. - Vol. 12. - № 6. - P. 378–82.

47. Ishibashi, Y. et al. Glucagon-like peptide-1 suppresses advanced glycation end product-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells by reducing advanced glycation end product receptor level // *Metabolism*. - 2011. - Vol. 60. - № 9. - P. 1271–1277.

48. Jefferson, J., Shankland, S., Pichler, R. Proteinuria in diabetic kidney

disease: a mechanistic viewpoint. // *Kidney International*. - 2008. - Vol. 74. - № 1.- P. 22–36.

49. Junaid, A., Amara, F. Osteopontin : correlation with interstitial fibrosis in human diabetic kidney and PI3-kinase-mediated enhancement of expression by glucose in human proximal tubular epithelial cells // *Histopathology*. - 2004. - Vol. 44. - № 2. - P. 136–146.

50. Kado, S. et al. Urinary type IV collagen as a marker for early diabetic nephropathy. // *Diabetes research and clinical practice*. - 1996. - Vol. 31. - № 1–3. - P. 103–108.

51. Kawachi, H. et al. Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: Identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome // *Clinical and Experimental Nephrology*. - 2009. - Vol. 13. - № 4. - P. 275–280.

52. Kestilä, M. et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome // *Molecular cell*. - 1998. - Vol. 1. - № 4. - P. 575–582.

53. Kilpatrick, E. The rise and fall of HbA1c as a risk marker for diabetes complications // *Diabetologia*. - 2012. - Vol. 55. - № 8. - P. 2089–2091.

54. Kimura, T. et al. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury // *Journal of the American Society of Nephrology*. - 2011. - Vol. 22. - № 5. - P. 902–913.

55. Koderä, R. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes // *Diabetologia*. - 2011. - Vol. 54. - № 4. - P. 965–978.

56. Krolewski, A. et al. Serum concentration of cystatin C and risk of end-stage renal disease in diabetes // *Diabetes Care*. - 2012. - Vol. 35. - № 11. - P. 2311–2316.

57. Lacquaniti, A. et al. «Normoalbuminuric» diabetic nephropathy: Tubular damage and NGAL // *Acta Diabetologica*. - 2013. - Vol. 50. - № 6. - P. 935–942.

58. Laffel, L. et al. The beneficial effect of angiotensin-converting enzyme inhibition with captopril on diabetic nephropathy in normotensive IDDM patients with microalbuminuria. North American Microalbuminuria Study Group. // *The American journal of medicine*. - 1995. - Vol. 99. - № 5. - P.497 - 504.

59. Lane, P. et al. Renal interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. // *Kidney International*. - 1993. - Vol. 43. - № 3. - P. 661–667.

60. Lankat-buttgereit, B., Stockmann, F. Detection of the human amide receptor on insulinoma-derived cell // *Digestion*. - 1994. - Vol. 55. - № 1. - P. 29–33.

61. Li, H. Src-family kinase fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin // *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. - 2004. - Vol. 15. - № 12. - P. 3006–3015.

62. Lou, N. et al. Urinary microvesicle-bound uromodulin : a potential molecular biomarker in diabetic kidney disease // *Journal of Diabetes Research*. - 2017. - Vol. 2017.

63. Lund-andersen, H., Parving, H., Pedersen, O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes // *The New England Journal of Medicine*. - 2008. - Vol. - 358. - № 6. - P. 580–591.

64. Marso, S. et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes // *The New England Journal of Medicine*. - 2016. - Vol. 375. - № 4. - P. 311–322.

65. Mathiesen, E. et al. Efficacy of captopril in postponing nephropathy in normotensive insulin dependent diabetic patients with microalbuminaria // *Annals of Internal Medicine*. - 1991. - Vol. 115. - № 3. - P. 74 - 87.

66. Mima, A. et al. Protective effects of GLP-1 on glomerular endothelium and its inhibition by PKC b activation in diabetes // *Diabetes*. - 2012. - Vol. 61. - № 11. - 2967 - 2979.

67. Mitsnefes, M. et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease // *Pediatric*

Nephrology. - 2007. - Vol. 22. - № 1. - P. 101–108.

68. Miyata, T. et al. Diabetic nephropathy: A disorder of oxygen metabolism? // *Nature Reviews Nephrology*. - 2010. - Vol. 6. - № 2. - P. 83–95.

69. Mogensen, C. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. // *Kidney International*. - 1987. - Vol. 31. - № 2. - P. 673–689.

70. Mogensen, C. How to protect the kidney in diabetic patients // *Diabetes*. - 1997. - Vol. 46. - № 2. - P. 104 - 111.

71. Morita, M. et al. Association of urinary type IV collagen with GFR decline in young patients with type 1 diabetes // *American Journal of Kidney Diseases*. - 2011. - Vol. 58. - № 6. - P. 915–920.

72. Mundel, P. Podocyte biology and response to injury // *Journal of the American Society of Nephrology*. - 2002. - Vol. 13. - № 12. - P. 3005–3015.

73. Mundel, P. Podocytes and the quest for precision medicines for kidney diseases // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. - 2017. - Vol. 469. - № 7–8. - P. 1029–1037.

74. Nagao, T. et al. Osteopontin plays a critical role in interstitial fibrosis but not glomerular sclerosis in diabetic nephropathy. // *Nephron Extra*. - 2012. - Vol. 2. - № 1. - P. 87–103.

75. Nakamura, T. et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy // *Nephrology Dialysis Transplantation*. - 2000. - Vol. 15. - № 9. - P. 1379–1383.

76. Nathan, D. et. al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus // *The New England Journal of Medicine*. - 1993. - Vol. 329. - № 14. - P. 987–994.

77. Nathan, D. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: Overview // *Diabetes Care*. - 2014. - Vol. 37. - № 1. - P. 9–16.

78. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for

Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. - 2002. - P. 1-266.

79. Nauta, F. et al. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes // *Diabetes Care*. - 2011. - Vol. 34. - № 4. - P. 975–981.

80. Nicholas, S. et al. Critical role for osteopontin in diabetic nephropathy // *Kidney International*. - 2010. - Vol. 77. - № 10. - P. 588–600.

81. Nielsen, S. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: A cross-sectional study and the effects of lisinopril // *Diabetic Medicine*. - 2010. - Vol. 27. - № 10. - P. 1144 - 1150.

82. Nielsen, S. et al. Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients // *Diabetes Research and Clinical Practice*. - 2012. - Vol. 97. - № 1. - P. 71 -76.

83. Oldfield, M. et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE) // *Journal of Clinical Investigation*. - 2001. - Vol. 108. - № 12. - P. 1853–1863.

84. Pak, J. et al. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors // *Journal of Biological Chemistry*. - 2001. - Vol. 276. - № 13. - P. 9924–9930.

85. Panduru, N. et al. Osteopontin is a strong predictor of incipient diabetic nephropathy, cardiovascular disease, and all-cause mortality in patients with type 1 diabetes // *Diabetes Care*. - 2014. - Vol. 37. - № 9. - P. 2593–2600.

86. Park, C. et al. Exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice // *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. - 2007. - Vol. 18. - № 04. - P. 1227–1238.

87. Park, I. et al. Expression of transforming growth factor- β and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes // *Diabetes*. - 1997. - Vol. 46. - № 3. - P. 473–480.

88. Patari, A. et al. Nephriuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes // *Diabetes*. - 2003. - Vol. 52. - № 12. - P. 2969–2974.
89. Perkins, B. и др. Regression of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes // *n engl j med*. 2003. Т. 34823348. С. 2285–93.
90. Prajczer, S. et al. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression // *Nephrol Dial Transplant*. - 2010. - № 6. - P. 1896–1903.
91. Qian, Y. et al. From fibrosis to sclerosis: Mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy // *Diabetes*. - 2008. - Vol. 57. -№ 6. - P. 1439–1445.
92. Rampoldi, L. et al. The rediscovery of uromodulin (Tamm – Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease // *Kidney International*. - 2011. - Vol. 80. - № 4. - P. 338–347.
93. Reid, I. et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus // *The New England Journal of Medicine*. - 1993. - Vol. 329. - №14. - P. 977 - 986.
94. Remaratne, E. Serial measurements of cystatin c are more accurate than creatinine-based methods in detecting declining renal function in type 1 diabetes // *Diabetes Care*. - 2008. - Vol. 31. - № 5. - P. 7–9.
95. Ricci, Z., Ronco, C. Today’s approach to the critically ill patient with acute kidney injury // *Blood Purification*. - 2009. - Vol. 27. - № 1. - P. 127–134.
96. Sabbiseti, V. et al. Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type 1 diabetes // *Journal of the American Society of Nephrology*. - 2014. - Vol. 25. - № 10. - P. 2177–2186.
97. Saraheimo, M. et al. Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in Type 1 diabetic patients // *Diabetologia*. - 2003. - Vol. 46. - № 10. - P. 1402–1407.
98. Schlatter, P. et al. Glucagon-like peptide 1 receptor expression in primary

porcine proximal tubular cells // Regulatory peptides. - 2007. - Vol. 141. - № 1-3. - P. 120–128.

99. Sejdiu, I., Torffvit, O. Decreased urinary concentration of Tamm-Horsfall protein is associated with development of renal failure and cardiovascular death within 20 years in type 1 but not in type 2 diabetic patients. // Scandinavian journal of urology and nephrology. - 2008. - Vol. 42. - № 2. - P. 168–174.

100. Serafini-Cessi, F., Malagolini, N., Cavallone, D. Tamm-Horsfall glycoprotein: Biology and clinical relevance // American Journal of Kidney Diseases. - 2003. - Vol. 42. - № 4. - P. 658–676.

101. Seufert, J., Gallwitz, B. The extra-pancreatic effects of GLP-1 receptor agonists: a focus on the cardiovascular, gastrointestinal and central nervous systems // Diabetes, obesity and metabolism. - 2014. - Vol. 16. - № 8. - P. 673–688.

102. Sharma, K., Ziyadeh, F. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator // Diabetes. - 1995. - Vol. 44. - № 10. - P. 1139 - 1146.

103. Simons, M. et al. Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm // The American journal of pathology. - 2001. - Vol. 159. - № 3. - P. 1069–1077.

104. Singh, D., Winocour, P., Farrington, K. Mechanisms of disease: The hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy // Nature Clinical Practice Nephrology. - 2008. - Vol. 4. - № 4. - P. 216–226.

105. Skoberne, A., Konieczny, A., Schiffer, M. Glomerular epithelial cells in the urine : what has to be done to make them worthwhile ? // American journal of physiology. Renal physiology. - 2009. - Vol. 296. - № 2. - P. 230–241.

106. Steffes, M. et al. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients // Kidney International. - 2001. - Vol. 59. - № 6. - P. 2104–2113.

107. Sthaneshwar, P., Chan, S. Urinary type IV collagen levels in diabetes mellitus // The Malaysian journal of pathology. - 2010. - Vol. 32. - № 1. - P. 43–47.

108. Suzuki, M. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a

biomarker of disease activity in pediatric lupus nephritis // *Pediatric Nephrology*. - 2008. - Vol. 23. - № 3. - P. 403–412.

109. Tang, S., Leung, C., Neng, K. Diabetic tubulopathy : an emerging entity // *Contributions to nephrology*. - 2011. - Vol. 170. - P. 124–134.

110. Thallas-Bonke, V., Cooper, M. Tandem inhibition of PKC in diabetic nephropathy: It takes two to tango? // *Diabetes*. - 2013. - Vol. 62. - № 4. - P. 1010–1011.

111. Thomas, M., Burns, W., Cooper, M. Tubular changes in early diabetic nephropathy // *Advances in chronic kidney disease*. - 2005. - Vol. 12. - № 2. - P. 177–186.

112. Thorup, C. et al. Increased tubuloglomerular feedback reactivity is associated with increased NO production in the streptozotocin-diabetic rat // *Journal of Diabetes and its Complications*. - 2000. - Vol. 14. - № 1. - P. 46–52.

113. [Torbjörnsdotter](#), T. et al. Widening of foot processes in normoalbuminuric adolescents with type 1 diabetes // *Pediatric Nephrology*. - 2005. - Vol. 20. - № 6. - P. 750–758.

114. Torffvita, O., Melanderb, O., Hulténb, U.L. Urinary excretion rate of Tamm-Horsfall protein is related to salt intake in humans // *Nephron. Physiology*. - 2004. - Vol. 97. - № 1. - P. 31–37.

115. Toyoda, M. et al. Endothelial Fenestration in Human Type 1 Diabetic // *Diabetes*. - 2007. - Vol. 56. - № 8. - P. 2155–2160.

116. Vaidya, V. et al. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase // *Kidney International*. - 2011. - Vol.79. - № 4. - P. 464–470.

117. Verma, R. et al. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization // *Journal of Clinical Investigation*. - 2006. - Vol. 116. - № 5. - P. 1346–1359.

118. Veron, D. et al. Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice

causes glomerular disease. // *Kidney International*. - 2010. - Vol. 77. - № 11. - P. 989–999.

119. Viberti, G. et al. Effect of captopril on progression to clinical proteinuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. European Microalbuminuria Captopril Study Group // *Journal of the American Medical Association*. - 1994. - Vol. 271. - № 4. - P. 275–279.

120. Websky, K., Reichetzeder, C., Hocher, B. Physiology and pathophysiology of incretins in the kidney // *Current opinion in nephrology and hypertension*. - 2014. - Vol. 23. - № 1. - P. 54 - 60.

121. Weil, E. et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy // *Kidney International*. - 2012. - Vol. 82. - № 9. - P. 1010–1017.

122. Welsh, G. et al. Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function // *Cell Metabolism*. - 2010. - Vol. 12. - № 4. - P. 329–340.

123. White, K. et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria // *Diabetes*. - 2002. - Vol. 51. - № 10. - P. 3083 - 3089

124. Wolak, T. et al. Osteopontin modulates angiotensin II-induced inflammation, oxidative stress, and fibrosis of the kidney // *Kidney International*. - 2009. - Vol. 76. - № 1. - P. 32–43.

125. Wolf, G., Ziyadeh, F. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy // *Nephron. Physiology*. - 2007. - Vol. 106. - № 2. - P. 26–31.

126. Xie, Y. et al. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney // *Kidney International*. - 2001. - Vol. 60. - № 5. - P. 1645–1657.

127. Yan, X. et al. Plasma concentrations of osteopontin, but not thrombin-cleaved osteopontin, are associated with the presence and severity of nephropathy and coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus // *Cardiovascular diabetology*. - 2010. - Vol. 9. - P. 1–8.

128. Yin, C., Wang, N. Kidney injury molecule-1 in kidney disease // *Renal failure*. - 2016. - Vol. 38. - № 10. - P. 1567 - 1573.

129. Zeni, L. et al. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease // *Journal of nephrology*. - 2017. - Vol. 30. - № 6. - P. 701–717.

130. Zhang, H. et al. Exenatide reduces urinary transforming growth factor- β 1 and type iv collagen excretion in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria // *Kidney & blood pressure research*. - 2012. - Vol. 35. - № 6. - P. 483–488.

131. Zhang, Z., Humphreys, B., Bonventre, J. Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region // *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. - 2007. - Vol. 18. - № 10. - P. 2704–2714.

132. Zhao, X. et al. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells // *International journal of molecular medicine*. - 2015. - Vol. 35. - № 3. - P. 684–692.

133. Zhu, J. et al. Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes // *Kidney International*. - 2008. - Vol. 73. - № 5. - P. 556–566.

134. Li, W. et al. Inhibition of the expression of TGF- β 1 and CTGF in human mesangial cells by exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist // *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. - 2012. - Vol. 30. - № 3. - 749 - 757.