

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

АВТОРЕФЕРАТ

**Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва - 2019 год

Работа выполнена в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (кафедра эндокринологии и диабетологии Педиатрического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации)

Научный руководитель

Шестакова Марина Владимировна
академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Бирюкова Елена Валерьевна
доктор медицинских наук, профессор
кафедры эндокринологии и диабетологии
лечебного факультета ФГБОУ ВО
МГМСУ имени А.И. Евдокимова Минздрава
России

Климонтов Вадим Валерьевич
доктор медицинских наук, профессор РАН,
заместитель руководителя филиала по
научной работе, заведующий лабораторией
эндокринологии НИИ клинической и
экспериментальной лимфологии – филиал
ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики
СО РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится 28 ноября 2019г. ____ на заседании диссертационного совета Д 208.126.01 в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117036, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России <https://www.endocrincentr.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета
доктор медицинских наук

Суркова Елена Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Диабетическая нефропатия (ДН) удерживает лидирующие позиции в структуре больных, требующих проведения заместительной почечной терапии (программный гемодиализ, трансплантация почки), что определяет чрезвычайную актуальность проблемы ранней диагностики этого инвалидизирующего осложнения. В структуре смертности пациентов с СД в РФ терминальная почечная недостаточность вследствие ДН является 3-й по частоте причиной смерти у пациентов с СД 1 типа (7,1 %) и 7-й у пациентов с СД 2 типа (1,8%). (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2017).

Ведущая роль в развитии и прогрессировании этого осложнения отводится гипергликемии. 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.

В настоящее время диагностика ДН у пациентов с СД 1 типа основывается на оценке уровня альбуминурии (АУ). Однако чувствительность и специфичность «альбуминцентрической» концепции ДН в диагностике доклинической стадии диабетического поражения почек ограничена. Продемонстрировано, что микроальбуминурия (МАУ) не всегда коррелирует с выраженностью гломерулярных изменений, лишь треть пациентов с МАУ прогрессирует до стадии протеинурии, и наоборот – несмотря на отсутствие или регресс МАУ в ряде случаев может отмечаться прогрессирующее снижение фильтрационной функции почек. При СД 1 типа развитие МАУ, как правило, отмечается через 5 лет после дебюта заболевания, в то время как типичные морфологические изменения в почках могут отмечаться уже через 2 года после манифестации СД.

Таким образом, поиск более ранних и специфичных, чем МАУ, биомаркеров поражения почек при СД представляет особую актуальность для оптимизации подходов к доклинической диагностике и профилактике ДН.

Доклиническая диагностика почечного повреждения позволит инициировать ренопротективную терапию на более ранней стадии. До настоящего времени с целью нефропротекции использовались две группы препаратов, блокирующих ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС) - блокаторы рецепторов ангиотензина II (БРА) и ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ). Несмотря на активное применение блокаторов РААС, уменьшающих АУ, пациенты с ДН, по-прежнему, остаются в группе высокого риска

прогрессирующего снижения почечной функции, что обуславливает необходимость поиска дополнительных путей нефропротекции, в том числе среди инновационных классов сахароснижающих препаратов (ССП).

Агонисты рецепторов ГПП-1 (а-рГПП-1) являются новым классом ССП, обладающих высокой сахароснижающей активностью с низким риском гипогликемий и дополнительным благоприятным эффектом в отношении снижения веса. Наряду с этим в последнее время широко обсуждаются плейотропные эффекты а-рГПП-1, в том числе нейро-, васкуло- и нефропротективные. Таким образом, изучение потенциальных эффектов ССП в отношении функции почек, открывает перспективы превентивной нефропротекции на доклинических стадиях ДН у больных СД.

Таблица 1. Предполагаемые биомаркеры диабетической нефропатии.

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

Цель работы: определить диагностическую значимость 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 ранней (до развития МАУ) стадии поражения почек.

Задачи:

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 доальбуминурической стадии повреждения почек.

Научная новизна исследования.

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, не связанные с их сахароснижающим эффектом, у больных СД 1 типа на основании оценки динамики стандартных клинических и исследуемых биомаркеров поражения почек.

Теоретическая и практическая значимость исследования

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 нефропротективных свойств а-рГПП-1 у пациентов СД 1 типа, возможно, откроет новые перспективы нефропротекции при 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 при СД 1 типа.

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.

Степень достоверности и апробация результатов работы

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

Результаты работы были доложены и обсуждены на VII Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва 2015 г.), VII Всероссийском конгрессе эндокринологов (Москва 2016 г.), 18-м Конгрессе Европейской ассоциации эндокринологов (ЕСЕ, Мюнхен 2016 г.), 5-м Европейском конгрессе по атеросклерозу (EAS, Инсбрук 2016 г.), 52-м Конгрессе Европейской ассоциации по изучению диабета (EASD, Мюнхен 2016 г.).

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 входят в перечень отечественных рецензируемых журналов, рекомендуемых для публикации основных результатов исследований.

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе 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 клинко-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 информативности 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.



Рис.1. Дизайн исследования.

I. Одномоментное исследование: оценка информативности 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 сопоставимых по возрасту и полу без нарушений углеводного обмена и поражения почек. Все пациенты, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие на участие в научно-исследовательском протоколе.

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 A2 и A3 - 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. Гликированный гемоглобин (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

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

В проспективной части работы пациенты из группы A1 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, остеопонтин) и в моче (нефрин, подоцин).

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.

Критериями исключения были стандартные противопоказания для терапии а-рГПП-1.

Этическая экспертиза.

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

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 С) определялись 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 С, уромодулин), USCN (KIM-1, подоцин), eBioscience (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 концентрация осуществляли с помощью программы Workout 2.5 (Perkin Elmer, Англия). Вычисленные концентрации мочевых биомаркеров были нормализованы по уровню креатинина мочи.

Статистическая обработка результатов

Проверка нормальности распределения количественных признаков осуществлялась с использованием критерия Шапиро-Уилка, проверка равенства генеральных дисперсий с помощью критериев Фишера и Кохрэна. В работе использовались следующие методы

статического анализа: анализ таблиц сопряженности с помощью критерия χ^2 -квадрат, непараметрический U- критерий Манн-Уитни для двух независимых выборок, непараметрический дисперсионный анализ ANOVA Краскела –Уоллиса для 3 и более независимых выборок, корреляционный анализ взаимосвязей признаков осуществлялся с помощью критерия 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: площадь под характеристической кривой (AUC ROC), чувствительность, специфичность. Оценка качества модели проводилась в соответствии с экспертной шкалой для значений AUC. 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 проводился 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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

I. Одномоментное исследование: оценка информативности исследуемых биомаркеров.

Клиническая характеристика исследуемых групп представлена в табл. 3. Пациенты с СД и группы здорового контроля были сопоставимы по полу, возрасту и основным клиническим параметрам, влияющим на функцию почек (ИМТ, АД, HbA1c).

Таблица 3. Клиническая характеристика пациентов с 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 EPI), мл/мин/1,73 м ²	103[97; 110]	107[96; 120]	107[81; 119]	44[35; 80]	0,004 ^d
Альбумин мочи, мг/л	6 [2; 10]	10[5; 14]	35[27; 47]	829[454;1775]	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 A1 и A2 с помощью U-критерия Манна-Уитни

d- сравнение групп A2 и A3 с помощью U-критерия Манна-Уитни

параметр	Контроль (n=37)	A1 (n=42)	A2 (n=43)	A3 (n=20)	p
Мочевые биомаркеры					
Уромодулин, мг/л	4894,5 [2652,0;7920,1]	2971,2 [897,3;4174,5]	2498,1 [1030,9;3778,2]	1678,0 [834,5;1974,6]	0,04* 0,05 ^a 0,83 ^b 0,11 ^c
Уромодулин/креатинин, мг/ммоль	421,2 [324,6;497,0]	209,1 [72,2;340,4]	181,0 [66,9;333,6]	154,3 [117,2;217,3]	0,001* 0,04 ^a 0,06 ^b 0,03 ^c
Нефрин, нг/мл	0,06 [0,05;0,11]	0,09 [0,06;0,14]	0,06 [0,05;0,08]	0,03 [0,03;0,08]	0,04* 0,42 ^a 0,03 ^b 0,93 ^c
Нефрин/креатинин, нг/ммоль	0,003 [0,002;0,007]	0,11 [0,08;0,21]	0,06 [0,03;0,09]	0,11 [0,07;0,26]	0,01* 0,04 ^a 0,03 ^b 0,02 ^c
Подоцин, нг/мл	0,28 [0,01;0,97]	0,43 [0,01;1,23]	0,45 [0,04;1,67]	2,01 [0,01;5,60]	0,02* 0,56 ^a 0,99 ^b 0,02 ^c
Подоцин/креатинин, нг/ммоль	0,007 [0,002;0,008]	0,39 [0,11;0,69]	0,25 [0,11;0,67]	0,67 [0,11;0,99]	0,03* 0,001 ^a 0,02 ^b 0,004 ^c
Коллаген IV типа, нг/мл	3,48 [2,82;4,32]	3,85 [1,55;5,13]	5,34 [3,73;8,01]	8,49 [6,73;10,36]	0,001* 0,24 ^a 0,01 ^b 0,004 ^c
Коллаген IV типа/креатинин, нг/ммоль	0,03 [0,01;0,039]	0,51 [0,04;1,30]	1,35 [0,12;4,70]	3,12 [1,08;6,90]	0,001* 0,02 ^a 0,04 ^b 0,02 ^c
NGAL, нг/мл	7,4 [2,2;11,2]	9,8 [5,1;14,6]	9,7 [2,5;18,9]	21,7 [14,9;58,2]	0,019* 0,47 ^a 0,94 ^b 0,003 ^c
NGAL/креатинин, нг/ммоль	1,21 [0,08;6,61]	1,58 [0,15;10,21]	3,17 [0,06;37,53]	9,36 [0,65;26,98]	0,007* 0,08 ^a 0,04 ^b 0,009 ^c
KIM-1, нг/мл	1292,5 [192,2;3087,7]	1171,2 [76,5;3717,0]	1259,9 [116,6;4260,2]	1378,6 [439,6;4836,4]	0,99* 0,86 ^a 0,99 ^b 0,81 ^c
KIM-1/креатинин, нг/ммоль	116,4 [27,6;235,7]	141,7 [10,5;528,5]	146,7 [19,5;578,4]	209,8 [64,8;429,7]	0,25* 0,83 ^a 0,61 ^b 0,06 ^c

Цистатин С, мг/л	8,94 [0,48;29,09]	13,43 [0,43;44,06]	11,48 [1,08;62,40]	56,65 [14,18;18,29]	0,015* 0,22 ^a 0,35 ^b 0,003 ^c
Цистатин С/креатинин, нг/ммоль	0,97 [0,19;2,24]	1,27 [0,53;4,93]	1,48 [0,14,1;4,33]	13,04 [1,33;38,98]	0,002* 0,04 ^a 0,05 ^b 0,001 ^c
Плазменные биомаркеры					
NGAL, нг/мл	23,66 [20,04;47,18]	25,9 [20,5;33,4]	47,3 [22,9;33,8]	52,8 [35,4;63,8]	0,006* 0,09 ^a 0,1 ^b 0,02 ^c
KIM-1, мг/л	0,46 [0,06;2,07]	0,57 [0,03;2,11]	0,88 [0,04;5,66]	0,79 [0,02;8,33]	0,80* 0,77 ^a 0,79 ^b 0,6 ^c
VEFF, нг/мл	51,63 [8,10;156,63]	62,78 [9,30;220,95]	63,62 [8,72;279,42]	84,86 [17,25;238,23]	0,89* 0,46 ^a 0,86 ^b 0,79 ^c
Цистатин С, мг/л	0,73 [0,65;0,80]	1,45 [0,63;2,90]	1,36 [0,44;3,77]	3,73 [1,31;4,54]	0,04* 0,004 ^a 0,07 ^b 0,03 ^c
Остеопонтин, нг/мл	58,3 [40,7;64,1]	104,6 [44,4;281,5]	117,4 [44,0;266,3]	149,5 [68,8;213,6]	0,001* 0,03 ^a 0,06 ^b 0,003 ^c

* сравнение группы СД и здорового контроля с помощью рангового анализа вариаций ANOVA Краскела-Уоллиса

a - сравнение группы А1 и здорового контроля с помощью U-критерия Манна-Уитни

b - сравнение группы А1 и А2 с помощью U-критерия Манна-Уитни

c - сравнение группы А2 и А3 с помощью U-критерия Манна-Уитни

Мочевые биомаркеры.

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, достоверно превышая показатели у здорового контроля ($p=0,02$) и увеличиваясь по мере прогрессирования ДН от стадии А1 к А3. (рис.2). Наибольшая коллагенурия была зафиксирована у пациентов в группе А3, 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. 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 длительностью СД ($r=0,31$; $p=0,02$). Отрицательная корреляционная взаимосвязь установлена между уровнем коллагена и СКФ ($r=-0,55$; $p<0,001$).

Медиана мочевой экскреции уромодулина в группе больных СД была значительно ниже, чем у здорового контроля (179 [77;318] и 421 [324;497], 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. Снижение уровня уромодулина в группе А3 не имело достоверных различий по сравнению с группами А1 и А2. (рис.3). 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 ($r=-0,33$; $p=0,05$).

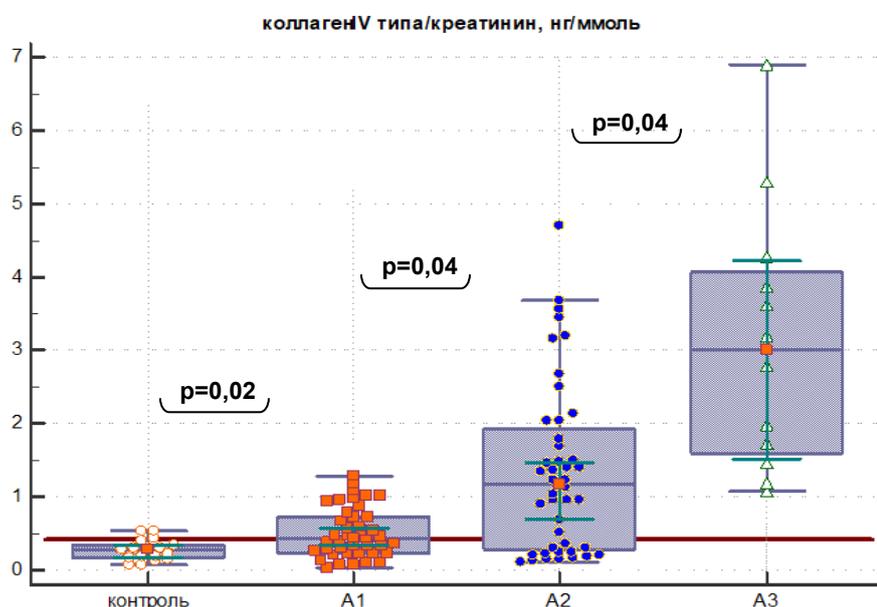


Рис. 2. Коллаген IV типа/креатинин.

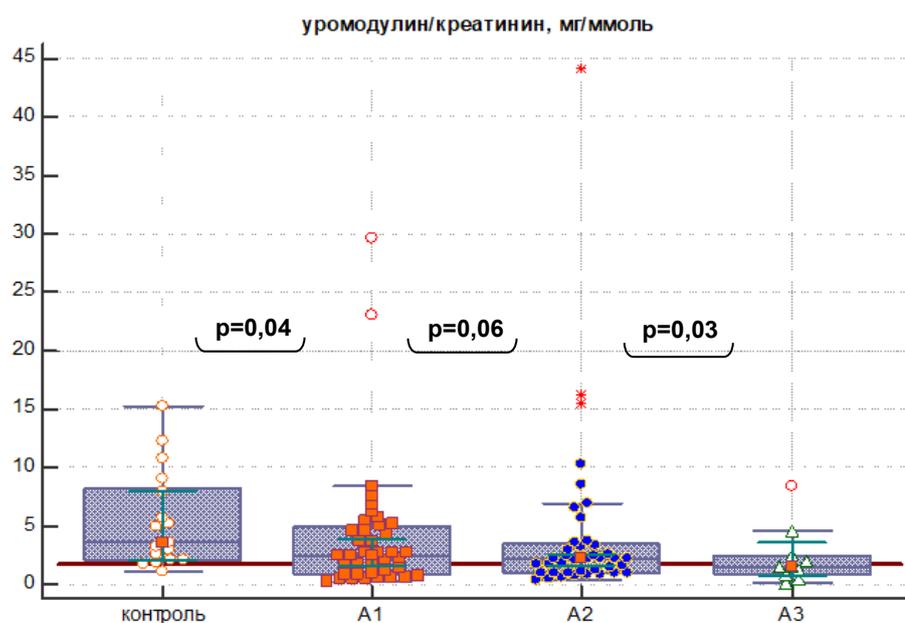


Рис. 3. Уромодулин/креатинин.

Мочевая экскреция подоцитспецифичных белков (нефрин, подоцин) в группе СД достоверно превышала показатели у здоровых лиц ($p=0,01$ и $p=0,03$, соответственно). (рис.4,5). При определении взаимосвязи с классическими маркерами ДН установлена корреляция между уровнем подоцина СКФ ($r=0,41$, $p=0,008$) и креатинином крови ($r=-0,44$, $p=0,04$). Мочевая экскреция нефрина имела умеренную корреляционную взаимосвязь с длительностью заболевания ($r=0,3$, $p=0,01$) и уровнем АУ ($r=0,3$, $p=0,02$).

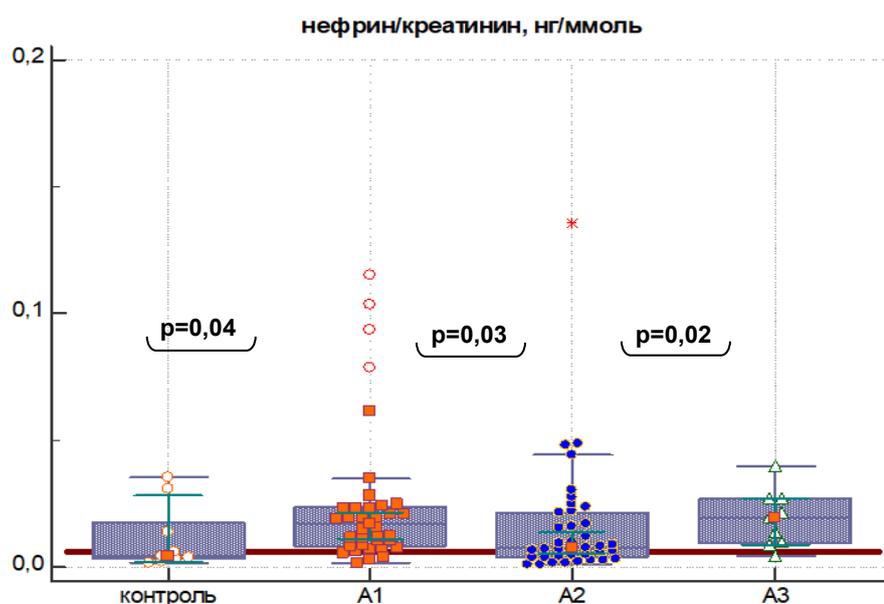


Рис. 4. Нефрин/креатинин.

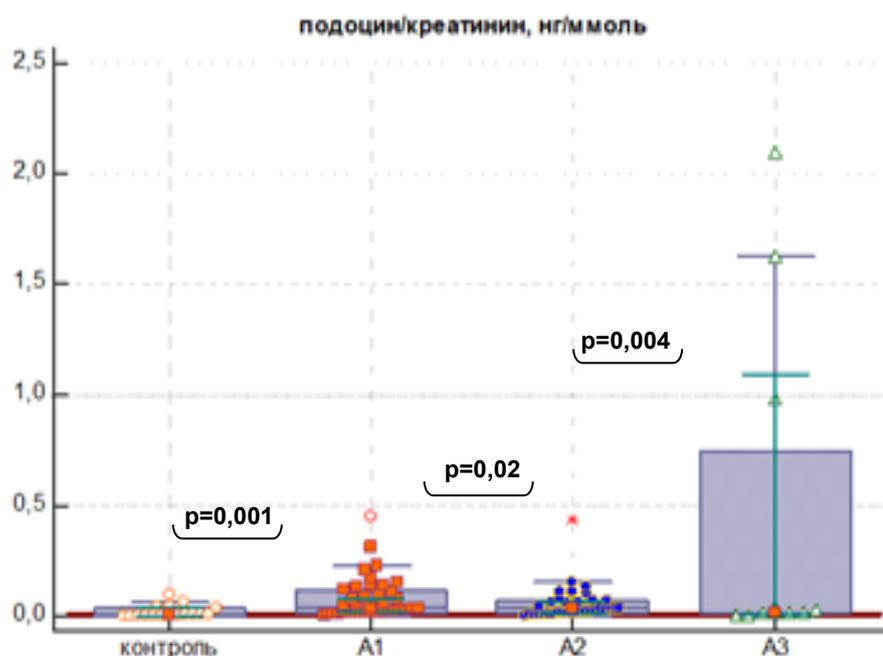


Рис. 5. Подоцин/креатинин.

Мочевая экскреция цистатина С в группе А1 достоверно превышала показатели экскреции у здорового контроля и прогрессировала по мере увеличения АУ. Установлена прямая связь мочевой концентрации цистатина С с длительностью заболевания ($r=0,41$, $p=0,009$) и отрицательная корреляционная взаимосвязь с уровнем СКФ ($r=-0,45$, $p=0,01$).

Маркер тубулярной дисфункции NGAL был выше во всех группах СД при сравнении с группой здорового контроля, увеличиваясь по мере прогрессирования АУ. Однако повышение уровня NGAL в группе А1 не имело статистических различий и было максимальным в группах А2 и А3 при сравнении со здоровым контролем.

Таким образом, достоверные различия на стадии А1 показали следующие мочевые биомаркеры: коллаген IV типа, нефрин, подоцин, уромодулин, цистатин С.

Плазменные биомаркеры.

Выявлено достоверное повышение уровня остеопонтин в плазме крови уже на стадии А1 по сравнению с группой здорового контроля, прогрессивно нарастающее у пациентов с более выраженным поражением почек (рис.6). Установлена прямая взаимосвязь между уровнем остеопонтин и креатинином крови ($r=0,25$, $p=0,01$).

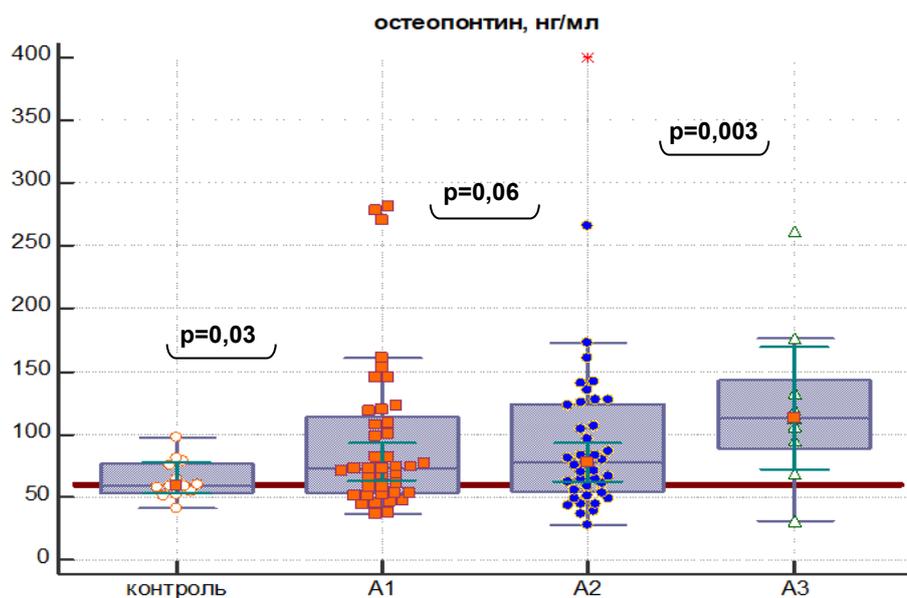


Рис. 6. Остеопонтин плазмы крови.

По уровню цистатина С получены достоверные различия у пациентов с СД в группе А1 и группы здорового контроля (рис.7). Установлена прямая корреляционная взаимосвязь между концентрацией цистатина С и креатинином крови ($r=0,50$, $p<0,001$), обратная взаимосвязь с уровнем СКФ ($r= - 0,50$, $p<0,001$).

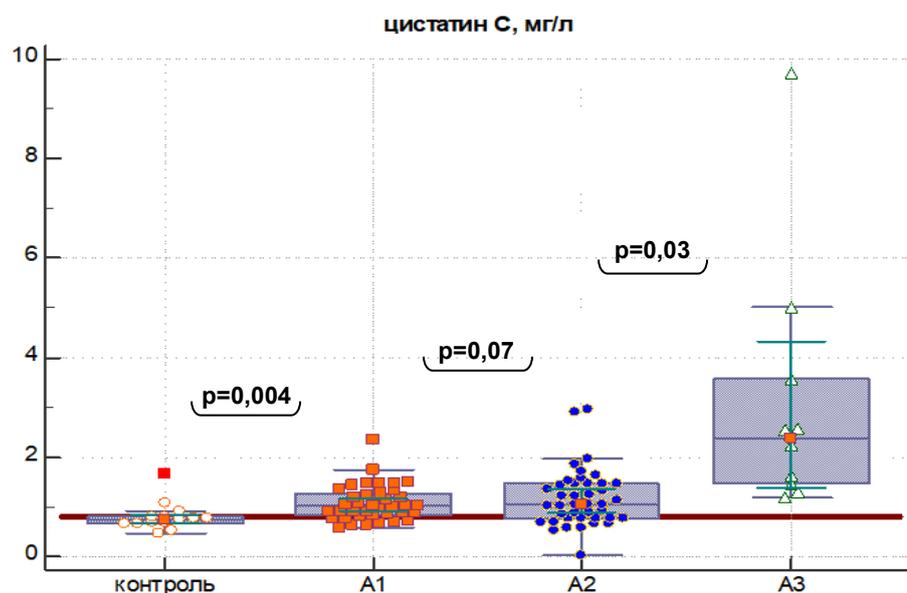


Рис. 7. Цистатин С плазмы крови.

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. При анализе уровня КИМ-1 в плазме крови достоверных меж- и внутригрупповых различий выявлено не было.

Диагностическая значимость исследуемых биомаркеров.

Таким образом, достоверные различия между группами здорового контроля и пациентами с СД 1 типа на стадии А1 были выявлены для 4 мочевых биомаркеров: нефрин, подоцин, коллаген 4 типа, уромодулин, и 2 плазменных: цистатин С и остеопонтин. Для оценки диагностической точности исследуемых биомаркеров выполнен сравнительный анализ площадей под характеристическими кривыми (ROC AUC) исследуемых биомаркеров, показавший более высокие значения чувствительности и специфичности по сравнению со стандартным исследованием АУ для двух мочевых биомаркеров: нефрин/креатинин, подоцин/креатинин и двух плазменных биомаркеров: остеопонтин, цистатин С (рис.8-10).

Для каждого из данных биомаркеров вычислены оптимальные значения порога отсечения (диагностической значимости) на основании максимальной чувствительности и специфичности в соответствии с наибольшим значением индекса Юдена (рис.8-10).

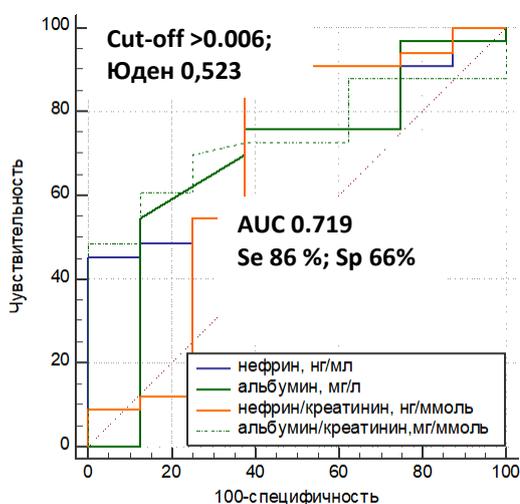


Рис. 8. ROC AUC Нефрин/креатинин.

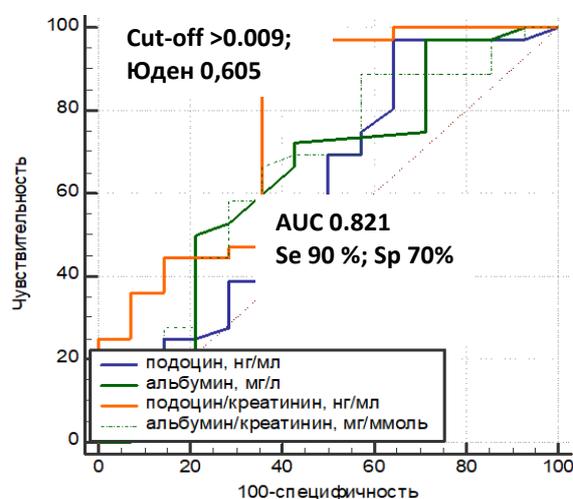


Рис. 9. ROC AUC Подоцин/креатинин.

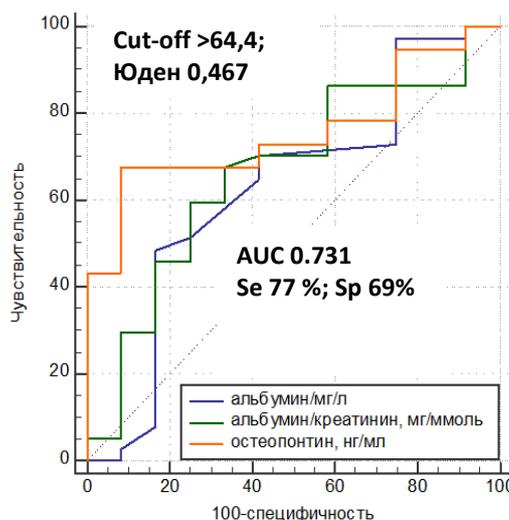


Рис. 9. ROC AUC Остеопонтин плазмы.

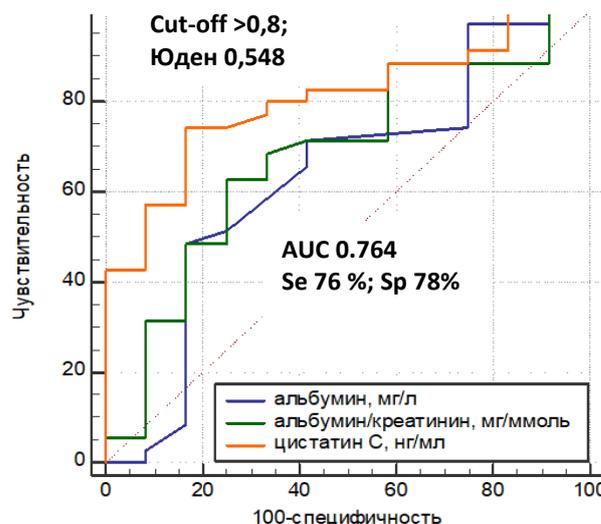


Рис. 10. ROC AUC Цистатин С плазмы.

Таким образом, определена панель наиболее чувствительных по сравнению с АУ биомаркеров (нефрин, подоцин, цистатин С, остеопонтин) для доклинической диагностики ДН, встречающаяся у 40,4 % пациентов с СД 1 типа на доальбуминурической стадии (рис.11).

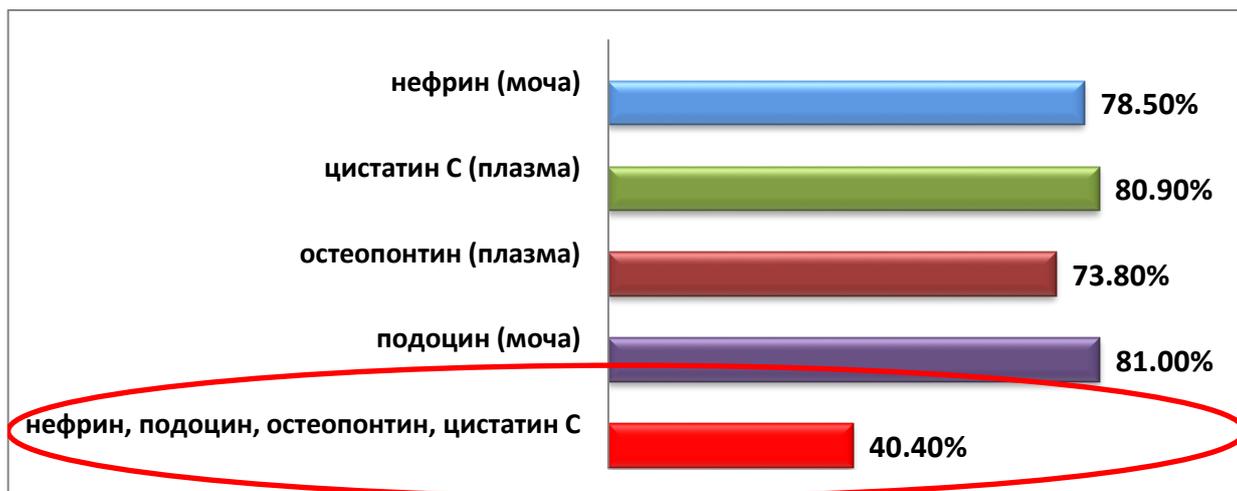


Рис. 11. Панель биомаркеров ранней диагностики ДН.

II. 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 явления (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. 4.1). При проведении перекрестного межгруппового анализа статистически значимых различий по уровню HbA1c выявлено не было ($p=0,32$, Манн-Уитни) (таб. 4.1). Показатели фильтрационной функции почек (креатинин, СКФ СКД EPI) и АУ в каждой из групп и между группами до и после терапии достоверно не различались (табл. 4.1).

Таблица 4.1. 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 (Вилкоксона)	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
p (Вилкоксона)	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
p (Вилкоксона)	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
p (Вилкоксона)	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
p (Вилкоксона)	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; 110]	0,36
p (Вилкоксона)	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
p (Вилкоксона)	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 биомаркеров, показавших диагностическую значимость на первом этапе исследования, выявил следующие статистически значимые различия: в группе терапии а-рГПП-1+инсулин отмечалось достоверное снижение уровня экскреции нефрина (однако межгрупповые различия не достигли статистической значимости ($p=0,05$), уровне биомаркеров плазмы крови отмечалось достоверное снижение остеопонтинина ($p<0,001$) и цистатина С ($p=0,01$) (табл. 4.2). Различий в уровне экскреции подоцина выявлено не было ($p=0,06$) (табл. 4.2).

Таблица 4.2. Динамика мочевых и плазменных биомаркеров до и через 6 месяцев терапии.

Параметр	Группа инсулина (n=15)	Группа а-рГПП-1 +инсулин (n=12)	Межгрупповые различия р (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
р (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
р (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
р (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
р (Вилкоксон)	0,56	0,02	

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

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 при отсутствии влияния на стандартные показатели функции почек – СКФ и АУ.

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 остеопонтин и цистатин 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 их 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 (А1). Рассчитаны пороговые диагностические значения исследуемых биомаркеров: нефрин > 0,006 нг/ммоль¹, подоцин > 0,009 нг/ммоль в моче¹, цистатин С > 0,8 мг/л, остеопонтин > 64,4 нг/мл в плазме².

4. У пациентов с СД 1 типа добавление к инсулинотерапии агониста рецепторов глюкагоноподобного пептида - 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, остеопонтин и цистатин 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.

¹ Значения мочевых биомаркеров нефрина (нг/ммоль) и подоцина (нг/ммоль) указаны по соотношению к уровню мочевого экскреции креатинина.

² В тексте диссертации в выводе 3 допущена опечатка в знаке пороговых диагностических значений исследуемых биомаркеров – правильно знак «>». Соответствующие изменения внесены в текст автореферата.

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 агониста рецепторов глюкагоноподобного пептида - 1 (лираглутид) на уровень экскреции и плазменную концентрацию ранних биохимических маркеров ДН указывает на возможное участие а-рГПП-1 в нефропротекции.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 входят в перечень отечественных рецензируемых журналов, рекомендуемых для публикации основных результатов диссертаций:

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 2 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 (ECE, 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, № 3, с. 62-66.
8. Негликемические эффекты инкретинов у пациентов с длительным течением сахарного диабета 1-го типа и хронической болезнью почек. Терапевтический архив, 2015, № 10, с. 54-61.

9. Ренальные эффекты агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида у больных сахарным диабетом 1-го типа. Терапевтический архив, 2018, № 6, с. 59-64.

Список сокращений.

АД – артериальное давление

АКС – альбумин-креатининовое соотношение (моча)

иАПФ – ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента

Агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 – аГПП-1

АУ – экскреция альбумина с мочой

БРА – блокаторы рецепторов ангиотензина-II

ДН – диабетическая нефропатия

ИМТ – индекс массы тела

ИФА – иммуноферментный анализ

СКФ – расчётная скорость клубочковой фильтрации по креатинину

СД – сахарный диабет

ССП – сахароснижающий препараты

ХБП – хроническая болезнь почек

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

НbA1c – гликированный гемоглобин

КИМ-1 – молекула почечного повреждения 1 типа

NGAL – липокалин ассоциированный с нейтрофильной желатиназой