Экспериментальные статьи

УДК 616.61:616.379-008.64:612.086.2

БАЙРАШЕВА В. К.[1,2], БАБЕНКО А. Ю.[1,2], ДМИТРИЕВ Ю. В.[1], БАЙРАМОВ А. А.[1], ЧЕФУ С. Г. [1,2], ШАТАЛОВ И. С.[3], АРЕФЬЕВА А. Н. [2], ПЧЕЛИН И. Ю.[4], ХУДЯКОВА Н. В.[4], АЛИЕВ П. Н.[2], ГРИНЕВА Е. Н.[1,2]

Роль метформина в профилактике диабетической нефропатии при экспериментальном сахарном диабете 2 типа

1 Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
194156, Россия, Санкт-Петербург, пр. Пархоменко, д.15
2 Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад.И. П. Павлова
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8
3 Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики
197101, Россия, Санкт-Петербург, Кронверкский просп., д. 49
4 Санкт-Петербургский государственный университет
199106, Россия, Санкт-Петербург, 21 линия В.О., д. 8а
e-mail: bayrasheva_med@mail.ru

Реферат

Введение и цель исследования. **Результаты ряда основополагающих для диабетологии исследований отчетливо продемонстрировали положительное влияние терапии метформином на риск макрососудистой патологии у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Тем не менее, влияние метформина на развитие и прогрессирование одного из наиболее серьезных микрососудистых осложнений заболевания—диабетической нефропатии — не является столь однозначным и требует проведения исследований в этой области. Цель работы. В хроническом эксперименте на модели диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа у крыс оценить влияние терапии метформином на морфофункциональное состояние почек.**

Материал и методы исследования. **Половозрелым самцам крыс стока Wistar, подвергшимся правосторонней нефрэктомии с последующим переводом на 5 недель на высокожировое питание, через 11 недель после индукции никотинамид-стрептозотоцинового сахарного диабета 2 типа была назначена терапия метформином в дозе 300 мг/кг с питьевой водой или крахмал (группа контроля).**

Результаты исследования. **Терапия метформином не оказывала значимого влияния на сывороточный креатинин, альбуминурию и клиренс креатинина, а также на выраженность морфологических изменений клубочков по окончании исследования на 30-й неделе. Однако, по сравнению с контрольной группой крыс с диабетом отмечалась тенденция к уменьшению морфологических проявлений поражения тубулоинтерстиция, а также значимое снижение экскреции с мочой молекулы почечного повреждения-1, которая рассматривается в качестве маркера поражения канальцев при сахарном диабете.**

Вывод. **Проведенное экспериментальное исследование продемонстрировало способность метформина ослаблять канальцевые нарушения при развитии диабетической нефропатии в условиях экспериментального сахарного диабета 2 типа, что, безусловно, требует проведения дальнейших исследований в этой области, в том числе и с участием пациентов.**

Ключевые слова: *метформин, почки, крыса, сахарный диабет 2 типа, диабетическая нефропатия.*

Введение

Сахарный диабет (СД) 2 типа и ассоциированные с ним метаболические и гемодинамические нарушения обуславливают развитие специфического поражения артерий, артериол, клубочков и канальцев почек — диабетической нефропатии (ДН), распространенность которой у пациентов с длительным стажем заболевания превышает 50 % [10]. Множество исследований демонстрируют значительное повышение риска сердечно-сосудистых катастроф у пациентов с диабетом 2 типа, осложненным развитием ДН, который в разы увеличивается по мере прогрессирования почечной дисфункции [30].

На сегодняшний день метформин считается единственным сахароснижающим препаратом (ССП), доказавшим в крупных эпидемиологических исследованиях способность уменьшать риск развития ряда макрососудистых осложнений СД 2 типа, таких как ишемический инсульт и инфаркт миокарда [14, 34]. Кардио- и вазопротективные свойства метформина подтверждены также в экспериментальных работах [23, 26]. Отчасти наблюдаемые позитивные сердечно-сосудистые эффекты метформина, помимо снижения уровня глюкозы крови без риска гипогликемий, объясняются плейотропным влиянием препарата на ряд ключевых патогенетических звеньев реализации кардиоваскулярной патологии. Среди них, безусловно, ведущее значение принадлежит воздействию препарата на инсулинорезистентность, избыточный вес, дислипидемию, реологические свойства крови, эндотелиальную дисфункцию и проявления оксидативного стресса [5]. Несмотря на то, что описанным факторам отводится немаловажная роль и в патогенезе диабетического поражения почек [10], данные о влиянии метформина на развитие и прогрессирование ДН не столь однозначны.

В ряде экспериментальных работ на культуре клеток и на моделях СД у грызунов продемонстрирована способность метформина предотвращать повреждение почечных структур за счет уменьшения процессов воспаления, гликооксидации, фиброзирования и окисления липидов [11, 21, 24, 37]. Тем не менее, результаты таких крупных клинических исследований, как UKPDS, ADOPT не показали значимого влияния метформина на альбуминурию [19, 28].

Альбуминурия, являясь одним из главных рутинных маркеров почечной дисфункции, в настоящее время рассматривается, в основном, в качестве показателя степени клубочковых нарушений [4]. Длительное время в качестве пускового механизма развития альбуминурии под воздействии описанных при СД 2 типа метаболических и гемодинамических факторов рассматривалось повреждение структур гломерулярного фильтрационного барьера в условиях формирования внутриклубочковой гипертензии [17]. При этом появление характерных для ДН канальцевых изменений рассматривали как вторичный по отношению к клубочковым изменениям процесс. Однако в ряде работ стали появляться альтернативные объяснения причин появления альбуминурии при ДН, демонстрирующие возможное первичное нарушение заряд-зависимой реабсорбции белков из ультрафильтрата в проксимальных канальцах почек [27]. Эти данные свидетельствуют о значимом вкладе тубулоинтерстиция в развитии и прогрессировании ДН, поскольку ранние канальцевые изменения, возникающие под воздействием метаболических и гемодинамических нарушений при СД 2 типа, могут подготовить почву для окислительного стресса, воспаления, гипоксии и тубулоинтерстициального фиброза, и тем самым для прогрессирования диабетической болезни почек [39]. Все это свидетельствует о важности оценки и канальцевой функции при СД 2 типа и ДН.

Одним из чувствительных маркеров канальцевой дисфункции является молекула почечного повреждения 1 типа (МПП-1) — трансмембранный гликопротеин, локализованный преимущественно в апикальной мембране проксимальных канальцев, содержание которого увеличивается на поверхности эпителиальных клеток вследствие различных причин (в условиях протеинурии и ишемии, при токсическом воздействии и т.п.) [16] и коррелирует со степенью тубулоинтерстициального повреждения и фиброза [32]. Кроме того, в эксперименте на крысах с СД этот протеин проявил себя как чувствительный биомаркер ранней диагностики ДН [11, 20].

В доступной литературе мы не обнаружили исследований, в которых оценивали влияние метформина на экскрецию канальцевых маркеров при ДН.

Цель исследования — в хроническом эксперименте на модели ДН при СД 2 типа у крыс оценить влияние терапии метформином на морфофункциональное состояние клубочкового и канальцевого отделов почек.

Материал и методы исследования

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова».

Исследование проведено на половозрелых самцах крыс стока Wistar (массой 180–210 г), которых содержали в условиях 12/12-часового светотемнового режима при свободном доступе к питьевой воде и пище. Крысам в условиях наркоза (пентобарбитал натрия 50 мг/кг внутрибрюшинно) с использованием заднепоясничного доступа выполняли правостороннюю нефрэктомию, перед этим с целью сохранения надпочечников почку декапсулировали. После хирургического вмешательства животные случайным образом были разделены на 3 группы и последующие 3 недели содержались на стандартном лабораторном пищевом рационе.

Поровну поделенная подгруппа крыс (n = 20), у которых в последующем моделировался СД, была переведена на 5 недель на высокожировое питание с добавлением к стандартному корму говяжьего сала (с итоговой общей калорийностью 450 ккал/100 г: 20 % жиров, 48 % углеводов, 20 % белков), по окончании которого крысам индуцировался никотинамид-стрептозотоциновый СД 2 типа [9], а через 12 недель после этого назначался метформин или крахмал (в качестве контроля):

1) крысы с СД, которым на 10 недель назначался метформин (Merck Sante s.a.s., Франция) в дозе 300 мг/кг/день с питьевой водой — группа СД 2 (метформин);

2) крысы с СД, не получавшие лечение, которым на 10 недель в качестве контрольного вещества в воду добавлялся крахмал 50 мг/л — группа СД 2 (контроль);

3) контрольная группа крыс (n=10), на протяжении всего эксперимента получавшая стандартное лабораторное питание (ООО «Лабораторкорм», Россия, рецептура ПК-120), который содержал 5 % жиров, 48 % углеводов и 18 % белков с общей калорийностью 310 ккал/100 г), которым вместо никотинамида (НА) и стрептозотоцина (СТЗ) вводились их растворители (контроль без СД 2). НА (Herba Hemosan, Австрия), растворенный в 0,9 % растворе хлорида натрия, вводился внутрибрюшинно в дозе 230 мг/кг, а через 15 мин производилась внутрибрюшинная инъекция СТЗ в дозе 65 мг/кг, растворенного в натриевом цитратном буфере. Цитратный буфер и раствор СТЗ готовился по ранее описанной методике [2] с использованием реагентов фирмы Sigma Aldrich, США. Через 7 дней выполнялся оральный глюкозотолерантноый тест по стандартной методике [33].

Определяемые лабораторные показатели

Диагностическими критериями СД 2 типа, согласно Peterson R.G., et al., считали измеренную гликемию натощак от 9,0 до 14,0 ммоль/л и рассчитанную площадь под кривой глюкозы по результатам орального глюкозотолерантного теста, в 2 раза превышающую показатель в контрольной группе без диабета [33].

По окончании эксперимента (на 30-й неделе) перед взятием крови и ткани почки у крыс собирали суточную мочу, для чего животные на 24 часа помещались в индивидуальные метаболические камеры. Определяли объем выделившейся мочи, концентрацию альбумина и МПП-1 (на автоматическом фотометре для микропланшет ELx800 (США) с использованием ИФА-наборов Assaypro, США и Abcam, соответственно), рассчитывали экскрецию альбумина и МПП-1 за 24 часа.

В крови определяли следующие показатели: гликированный гемоглобин (методом ВЭЖХ на анализаторе BioRad d10, США), глюкозу, креатинин, холестерин, триглицериды (с использованием реактивов и анализатора Cobas Integra 400 plus Roche, Франция), а также инсулин (ИФА-набор ALPCO Diagnostics, США). Рассчитывали индекс инсулинорезистентности HOMA-IR по формуле:

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

Рассчитывали клиренс креатинина по формуле:

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

Морфологические исследования

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

Окрашенные реактивом Шиффа срезы использовали для полуколичественного расчета индекса гломерулосклероза, который определяли как спадение и/или запустение клубочковых капилляров в сочетании с артериологиалинозом. Для этого не меньше 35 клубочков в срезе подвергались индивидуальному учету с присвоением условного балла каждому просмотренному клубочку: от «1» при вовлечении в патологический процесс до 25 % капиллярной сети с начальными признаками экспансии мезангия до «4» при почти полной облитерации клубочковых капилляров (от 75 до 100 %), после чего для каждого среза рассчитывался общий балл по формуле:

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

где N — количество клубочков в срезе, получивших соответствующий балл.

Срезы, окрашенные трихромом по Массону, использовали для расчета индекса тубулоинтерстициального фиброза. Для этого каждый почечный срез разделялся на 8 областей, микрофотографии которых (сделанные на увеличении x200) были обработаны в программе для анализа изображений ImageJ версия 1.5 (Национальный Институт здоровья). Каждой проанализированной области был присвоен условный балл: от «1» (при фиброзе менее 25 % общей площади) до «3» — при вовлечении более 50 % исследуемой области.

Для проведения иммуногистохимического исследования серийные срезы толщиной 4 мкм помещали на адгезивные предметные стекла (Menzel Glasser, Германия), покрытые полилизином, высушивали в течение ночи, депарафинировали путем обработки ксилолом и дегидратировали в спиртах возрастающей крепости, после чего промывали дистиллированной водой. Согласно стандартизированным протоколам, парафиновые срезы после высокотемпературной демаскировки и угнетения активности эндогенной пероксидазы в течение 20 мин 3 % раствором перекиси водорода промывали в фосфатном буфере, затем на срезы наносили блокирующий раствор (SpringBio, США) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Для проведения иммуногистохимической реакции срезы инкубировали при температуре + 5°С в течение 12 ч с первичными кроличьими поликлональными антителами к коллагену IV типа в разведении 1:500 (Abcam, Великобритания) с последующим после промывки добавлением вторичных козьих поликлональных антител (Abcam, Великобритания), меченных пероксидазой хрена. Интенсивность иммуногистохимического окрашивания в каждом срезе

при увеличении х100 была оценена полуколичественно в не менее чем 35 клубочках в баллах от 1 до 4 в зависимости от интенсивности желто-коричневой пигментации в области мезангиального матрикса и гломерулярной базальной мембраны.

Для всех экспериментальных групп были рассчитаны средние значения индексов, полученные для каждой крысы в группе.

Обработка полученных данных производилась с использованием стандартных непараметрических и параметрических тестов сравнения в пакетах статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft , США) и SPSS 20.0 (SPSS Inc., США). Все данные представлены в виде «среднее значение±стандартное отклонение». Значимыми считали различия при $P < 0,05$.

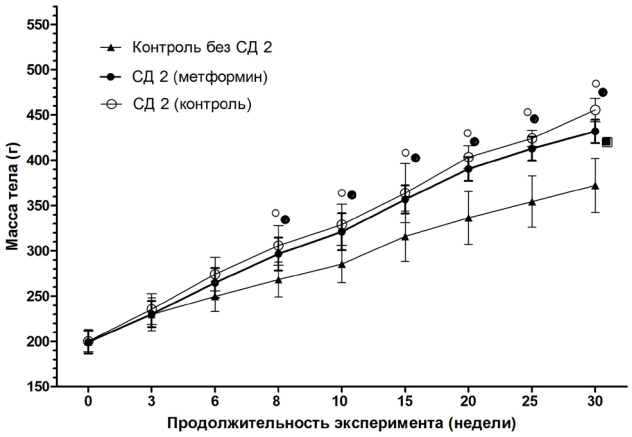


Рис. 1. Динамика массы тела крыс в сравниваемых группах на протяжении хронического эксперимента. Однофакторный дисперсионный анализ, post hoc анализ, тест Тьюки: ○ $P < 0,05$ в группе СД 2 (контроль) в сравнении с группой контроля без СД 2; ● $P < 0,05$ в группе СД 2 (метформин) в сравнении с группой контроля без СД 2; ■ $P < 0,05$ в группе СД 2 (метформин) в сравнении с группой СД 2 (контроль). С 3 по 8 неделю — добавление высокожирового питания в группах СД 2 (контроль) и СД 2 (метформин). Назначение метформина или плацебо крысам с СД 2 — с 20 по 30 неделю эксперимента

Результаты исследования их обсуждение

Для моделирования СД 2 типа и ДН у крыс использована ранее описанная нами модель, в которой на 20-й неделе эксперимента (через 12 нед после индукции никотинамид-стрептозотоцинового СД 2 типа) развивается значимое повышение альбуминурии с формированием ультраструктурных диабетических изменений в почечной ткани, подтверждающих ДН [3, 13].

Результаты исследования метаболических параметров и показателей углеводного обмена

Как видно из графика на рис. 1, через 1 неделю после введения НА и СТЗ (на 9-й неделе) впервые зафиксированы значимые различия в уровне тощаковой глюкозы крови в экспериментальных группах, когда оральный глюкозотолерантный тест показал развитие умеренной гипергликемии, характерной для экспериментального СД 2 типа у 7 крыс из 10 в группе СД 2 (контроль) и у 8 крыс из 10 в группе СД 2 (метформин). При этом уровень глюкозы натощак сохранялся на стабильно повышенном уровне вплоть до окончания эксперимента в обеих группах крыс с СД 2 (Рис. 2). Крысы в группе СД 2 (контроль), по сравнению с контрольными животными без СД 2, на 30-й неделе характеризовались значимым повышением массы тела, уровня гликированного гемоглобина, общего холестерина, триглицеридов и индекса инсулинорезистентности HOMA (Таблица 1).

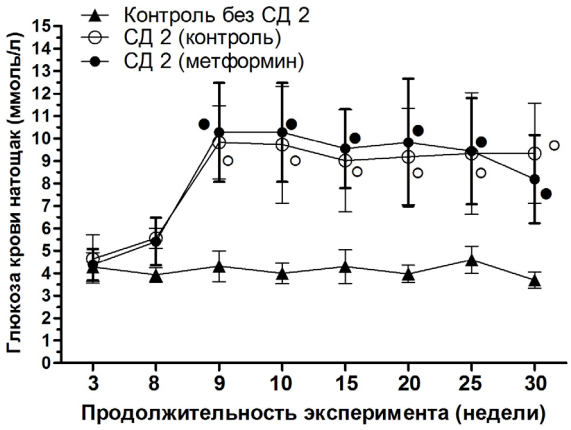


Рис. 2. Динамика тощакового уровня глюкозы крови в сравниваемых группах на протяжении хронического эксперимента (начиная с 3-й недели исследования). Однофакторный дисперсионный анализ, post hoc анализ, тест Тьюки: ○ $P < 0,05$ в группе СД 2 (контроль) в сравнении с группой контроля без СД 2; ● $P < 0,05$ в группе СД 2 (метформин) в сравнении с группой контроля без СД 2. С 3 по 8 неделю — добавление высокожирового питания в группах СД 2 (контроль) и СД 2 (метформин). На 8-й неделе — внутрибрюшинное введение НА и СТЗ. На 9-й неделе — проведение орального глюкозотолерантного теста. Назначение метформина или плацебо крысам с СД 2 — с 20 по 30 неделю эксперимента

Назначение 10-недельной терапии метформином привело к значимому снижению массы тела крыс по окончании эксперимента (432,0±12,9 г) в сравнении с контрольными крысами с СД 2, не получавшими лечение (455,6 ±13,0 г), $P = 0,013$, а также более низким значениям общего холестерина, триглицеридов и индекса инсулинорезистентности, при этом отсутствовала значимая разница с группой крыс без СД 2.

Несмотря на то, что в группе терапии метформином показатели углеводного обмена (уровень глюкозы крови натощак и гликированный гемоглобин) были ниже (7,6±0,82 ммоль/л и 6,67±0,72 %) по сравнению с крысами с СД 2 без лечения (9,3±2,22 ммоль/л и 6,94±0,27 %) , эта разница оказалась статистически незначимой ($P = 0,12$ и $P = 0,37$, соответственно).

В ряде экспериментальных работ у крыс с СД также не было зафиксировано значимого снижения показателей гликемии на терапии метформином [11, 24, 26], которое авторы связывали с небольшой продолжительностью эксперимента или использованием невысоких доз препарата (100–350 мг/кг). Так, в работе Kim J. et al. длительность терапии метформином в дозе 350 мг/кг составляла 17 недель, Takiyama Y. et al. оценивали эффект препарата на протяжении

Суммирующая таблица с основными метаболическими показателями по окончании эксперимента в сравниваемых экспериментальных группах

Таблица 1

Оцениваемый показатель (среднее значение± среднеквадратичное отклонение)	Экспериментальные группы			
	Контроль без СД 2	СД 2 (контроль)	СД 2 (метформин)	P♯ (сравнение 3 групп)
Масса тела, г	372,3±29,8	455,6 ±13,0*	432,0±12,9*○	< 0,00001
HbA1 c, %	3,98±0,26	6,94±0,27 *	6,67±0,72*	< 0,00001
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	3,7±0,36	9,3±2,22*	7,6±0,82*	< 0,0001
HOMA-IR	2,01±0,22	2,91±0,70*	2,20±0,47	0,036
Общий холестерин, ммоль/л	1,63±0,27	2,74±0,21*	2,13±0,65	0,0016
Триглицериды, ммоль/л	0,70±0,17	0,89±0,19●	0,84±0,40	0,47

Примечание: ♯ Результаты однофакторного дисперсионного анализа. Post hoc анализ (тест Тьюки): * — P < 0,05 в сравнении с группой контроля без СД 2.○ P < 0,05 СД 2 (метформин) vs СД 2 (контроль). ● P = 0,034 в сравнении с группой контроля без СД 2 (U-критерий Манна-Уитни)

Суммирующая таблица с показателями функции почек по окончании эксперимента в сравниваемых экспериментальных группах

Таблица 2

Оцениваемый показатель (среднее значение± среднеквадратичное отклонение)	Экспериментальные группы			
	Контроль без СД 2	СД 2 (контроль)	СД 2 (метформин)	P♯ (сравнение 3 групп)
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	41,9±4,1	69,0±4,3*	63,8±10,2*	< 0,00001
Клиренс креатинина, мл/мин/кг	1,28±0,38	0,89±0,10*	0,85±0,13*	0,008
Альбумин мочи, мкг/24 ч	71,4±26,4	2263,8±394,5*	1743,5±476,5*	< 0,000001
Молекула повреждения почек-1 мочи, нг/24 ч	1,10±0,40	6,29±1,76*	3,54±1,17*●	< 0,00001

Примечание: ♯ Результаты однофакторного дисперсионного анализа. Post hoc анализ (тест Тьюки): * — P < 0,05 в сравнении с группой контроля без СД 2; ● P < 0,05 СД 2 (метформин) vs СД 2 (контроль)

30 недель [24, 37], тогда как в нашем исследовании период лечения был сокращен до 10 нед.

Полученные в эксперименте данные о влиянии метформина на метаболические показатели подтверждают известные позитивные свойства препарата в отношении инсулинорезистентности, абдоминального ожирения и дислипидемии, продемонстрированные в клинической практике [5–8, 34].

Лабораторные показатели почечной функции

Как видно из таблицы 2, на 30-й неделе эксперимента у крыс в описанной модели СД 2 типа развились основные лабораторные признаки дисфункции почек, характерные для ДН: значимое повышение уровня креатинина сыворотки, сопровождающееся снижением его клиренса, а также повышение суточной экскреции альбумина с мочой, в 30 раз превышающее уровень в группе крыс без СД 2. Кроме того, развитие ДН характеризовалось более чем 5-кратным увеличением экскреции МПП-1 .

Метформин значимо не влиял на клиренс креатинина и уровень альбуминурии, однако, эти показатели были ниже, чем в контрольной группе крыс с СД 2, не получавших лечения. Тем не менее, в группе терапии метформином отмечалось почти двукратное снижение экскреции МПП-1(3,54±1,17 нг/24 ч) в сравнении с крысами с СД 2 без терапии (6,29±1,76 нг/24 ч, P = 0,006).

Результаты морфологического исследования почечной ткани

Развитие ДН подтверждалось 5-кратным повышением значения индекса гломерулосклероза (Рис. 3 (б)) в контрольной группе крыс с СД 2 в сравнении

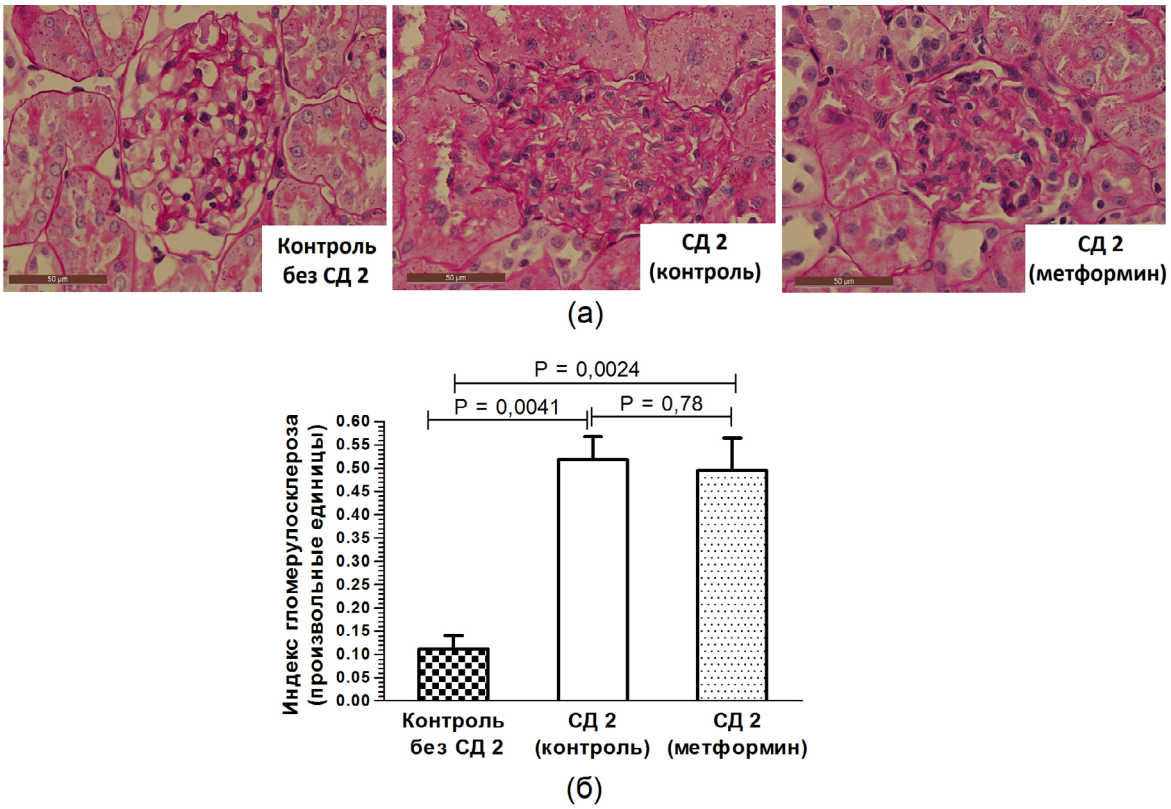


Рис. 3. Гломерулосклеротические изменения почечной ткани крыс в экспериментальных группах: а — репрезентативные микрофотографии. ШИК-окраска, увеличение × 640; б — рассчитанный индекс гломерулосклероза в экспериментальных группах

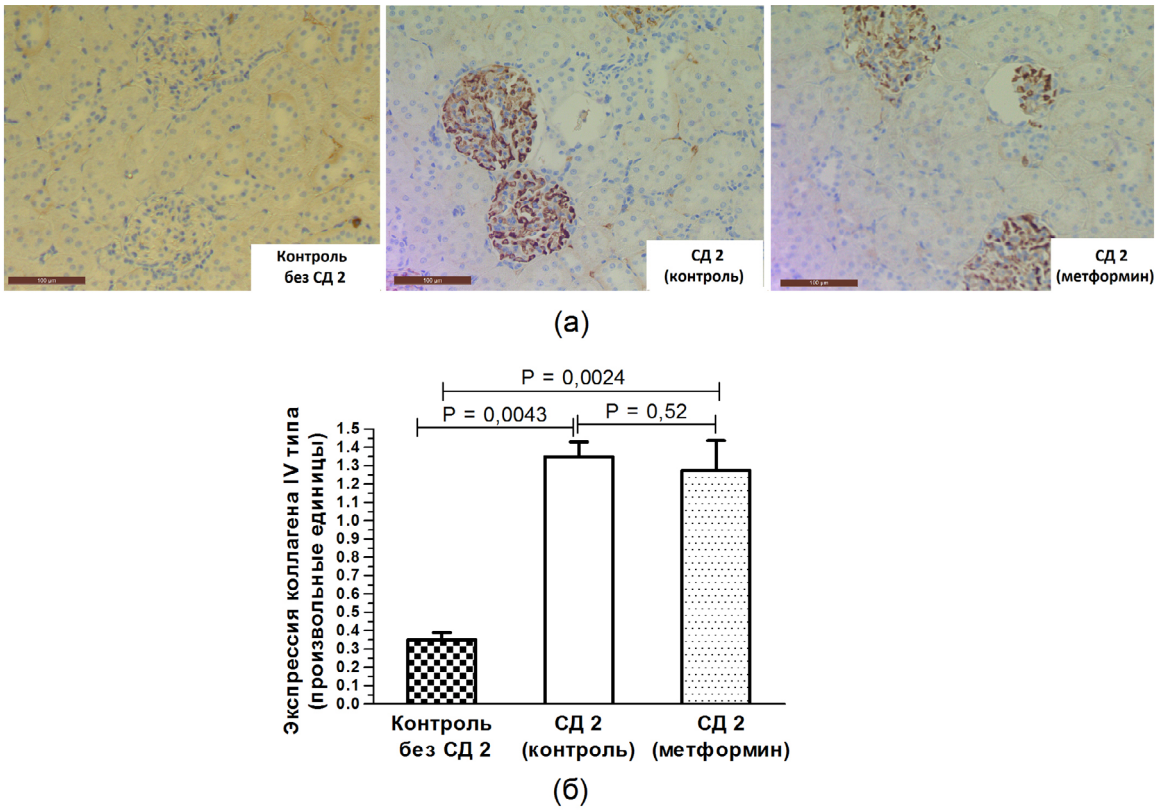
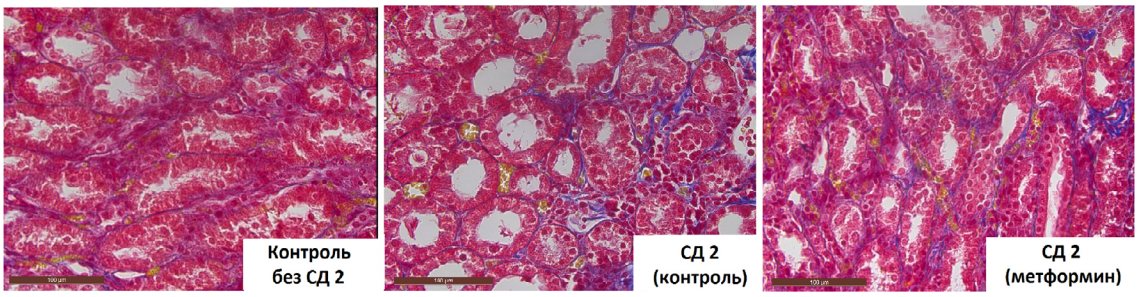
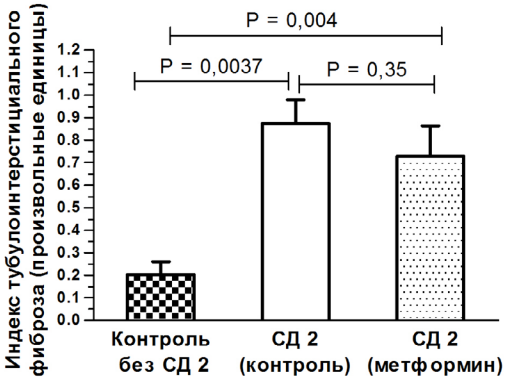


Рис. 4. Экспрессия коллагена IV типа в корковом веществе почки крыс в сравниваемых экспериментальных группах (иммуногистохимическое исследование). а — репрезентативные микрофотографии, увеличение × 320; б — рассчитанная полуколичественно интенсивность иммуногистохимической реакции с антителами к коллагену IV типа в сравниваемых группах



(а)



(б)

Рис. 4. Тубулоинтерстициальное повреждение почечной ткани крыс в экспериментальных группах. а — репрезентативные микрофотографии. Трихромное окрашивание по Массону, увеличение × 200; б — рассчитанный полуколичественно индекс тубулоинтерстициального фиброза в исследуемых группах

с крысами без диабета, а также признаками формирования интерстициального фиброза и частичной атрофии канальцевого эпителия (Рис. 5 (а, б). В обеих группах крыс с СД 2 отмечалось увеличение размеров клубочков, их гиперклеточность, неравномерное утолщение стенок капилляров, а в некоторых участках — сращение капиллярных петель с боуменовой капсулой (Рис. 3 (а)). Кроме того, в обеих группах крыс с СД 2 значимо была увеличена экспрессия коллагена IV типа в области клубочков почек (Рис. 4 (а)). При этом отмечалось расширение просвета канальцев с признаками частичной атрофии эпителия (Рис. 5(а)). Тем не менее, нами не зафиксировано развитие полного фиброза и окклюзии клубочков, а также формирование узелкового гломерулосклероза, характерных, как правило, для поздних, относительно необратимых стадий ДН с формированием постоянной протеинурии у пациентов с СД [10] .

Оцененные полуколичественно индексы гломерулосклероза, тубулоинтерстициального фиброза и экспрессии коллагена IV типа были ниже в группе терапии метформином по сравнению с контрольными крысами с СД 2 , однако, эти различия было незначимыми.

Полученные нами результаты, характеризующие изменения показателей клубочковой функции на фоне терапии метформином, несколько отличаются от описанных в зарубежной литературе. Так, в работе Kim J., et al. у крыс линии SDT, спонтанно развивающих СД 2 без ожирения, продемонстрировано значимое снижение альбуминурии, а в исследовании Alhaider A. , et al. на крысах со стрептозотоциновым СД - еще и уровня креатинина сыворотки на терапии метформином, сопровождающееся уменьшением выраженности диабет-индуцированного оксидативного стресса [11, 24]. Кроме того, улучшение почечной функции в этих исследованиях было ассоциировано с уменьшением экспансии мезангиального матрикса и степени повреждения структур клубочкового фильтра — гломерулярной базальной мембраны и подоцитов. Однако в описываемых работах использовались модели СД у крыс, в которых основным повреждающим фактором являлась выраженная гипергликемия с показателями тощаковой глюкозы крови 20 ммоль/л и выше, характерными более для моделей СД 1 типа [2, 33].

Вместе с тем, вероятнее всего, патогенез прогрессии ДН до стадии протеинурии при СД 2 типа и СД 1 типа различен [12]. Так, выраженная гипергликемия вызывает повреждение гликокаликса мембран клубочковых эндотелиоцитов, протеогликанов гломерулярной базальной мембраны и подоцитов, тем самым уменьшая заряд фильтрационного барьера, в норме обеспечивающего отталкивание одноименно заряженных белков плазмы [22, 40]. Это приводит к появлению альбуминурии с формированием вторичного альбумин-индуцированного повреждения проксимальных почечных канальцев [22, 38].

Однако, в описанной нами модели СД, в отличие от вышеупомянутых исследований, у крыс развивается умеренная гипергликемия, но при этом инициируются такие значимые метаболические нарушения,

запускающие процессы формирования ДН при СД 2 типа, как умеренная инсулинорезистентность, избыточный вес и дислипидемия [1, 10, 29].

С точки зрения патогенеза эти метаболические факторы, наряду с гипергликемией и гипертензией, являются активаторами локальной ренин-ангиотензиновой системы в тубулоинтерстиции. Активация ангиотензиновых рецепторов приводик к пролиферации фибробластов с последующим увеличением синтеза белков межклеточного матрикса (в частности, коллагенов), стимуляции оксидативного стресса и синтеза провоспалительных цитокинов, а через активацию эндотелина — к индукции ишемии и еще большему усугублению формирования тубулоинтерстициального фиброза [36].

Таким образом, описанные при СД 2 типа метаболические и гемодинамические факторы стимулируют тубулоинтерстициальное повреждение, которое, как считается, может являться пусковым механизмом формирования ДН не менее чем у 20 % пациентов с СД 2 типа [36]. Важность канальцев и интерстициальной ткани в патогенезе ДН подтверждается и известными данными о том, что степень прогрессии хронической болезни почек более коррелирует с канальцевыми морфологическими изменениями, а не с повреждением клубочкового аппарата [32, 35]. Косвенным подтверждением первичности изменений тубулоинтерстициальной ткани при СД 2 типа может служить повышенная экскреция ряда маркеров повреждения канальцев у пациентов с нормоальбуминурией [32, 16]. Примененный в нашей работе мочевой маркер МПП-1 в модели СД 2 типа у крыс проявил себя как чувствительный ранний маркер экспериментальной ДН [20].

Таким образом, обнаруженное в нашем исследовании значимое снижение экскреции МПП-1 в группе терапии метформином может свидетельствовать о наличии у метформина протективных свойств в отношении диабетического канальцевого почечного повреждения. Полученные нами данные подтверждают результаты исследований на культуре клеток и в эксперименте на моделях СД 2 типа у крыс, демонстрирующие способность метформина уменьшать повреждение эпителиоцитов проксимальных канальцев [21, 37]. В качестве одного из потенциальных механизмов нефропротекции в исследовании Takiyama Y., et al. рассматривается способность метформина уменьшать экспрессию канальцевыми эпителиоцитами индуцируемого при гипоксии фактора-1α (HIF-1α) [37].

Известно, что в патогенезе ДН гипоксии отводится значимая роль в качестве фактора прогрессии тубулоинтерстициального фиброза [18]. Хроническая интраренальная гипоксия, выявляемая у пациентов с СД даже без ДН [38], приводит к стимуляции экспрессии HIF-1-субъединицы в эпителиоцитах проксимальных канальцев с последующей стимуляцией их эпителиально-мезенхимальной трансформации в фибробласты, которые начинают активно синтезировать коллагены [31, 38].

В обсуждаемом исследовании Takiyama Y., et al. было показано, что метформин, являясь активатором энергетического сенсора АМФ-киназы, в условиях гипоксии приводит к увеличению количества глюкозных транспортеров в клетке и тем самым повышает утилизацию глюкозы, снижая потребность канальцевых эпителиоцитов в кислороде. В эксперименте на крысах линии ZDF это проявлялось в уменьшении морфологических проявлений тубулоинтерстициального фиброза после 30-недельной терапии метформином в дозе 250 мг/кг [37].

В нашем исследовании не было получено статистической значимости снижения клубочковых склеротических изменений и степени тубулоинтерстициального фиброза, выявленного при световой микроскопии, что может быть связано с меньшей продолжительностью периода назначения метформина. Не исключено, что более чувствительные морфологические методики, такие как электронно-микроскопическое исследование толщины канальцевой базальной мембраны и структуры эпителиоцитов проксимальных канальцев, позволили бы найти морфологическое подтверждение выявленного в нашей работе позитивного влияния метформина на канальцевую дисфункцию.

Выводы

1) Проведенное исследование на модели сахарного диабета 2 типа у крыс показало, что назначение животным на стадии значимого повышения альбуминурии терапии метформином в дозе 300 мг/кг на протяжении 10 недель приводит к значимому уменьшению экскреции молекулы почечного повреждения-1;

2) Полученные данные могут свидетельствовать о наличии у метформина протективных свойств в отношении канальцевого эпителия, напрямую не зависящих от сахароснижающего действия препарата, и отчасти могут быть связаны со способностью препарата позитивно влиять на такие смоделированные в эксперименте факторы риска диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа, как избыточный вес, умеренная дислипидемия и инсулинорезистентность;

3) Затронутая научная проблема требует дальнейшего изучения с проведением как доклинических исследований с расширенным спектром морфологических и включением молекулярного-генетических методов с целью изучения потенциальных механизмов обнаруженного нефропротективного свойства метформина, так и продолжительных РКИ с оценкой у пациентов, помимо традиционных почечных показателей, динамики маркеров канальцевой дисфункции на терапии метформином.

Исследование выполнено с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ N 15-04-08138.

Литература

1. *Бабенко А. Ю., Байрашева В.К. Диабетическая нефропатия: зависит ли ренопротекция от выбора сахароснижающей терапии? // Медицинский совет. 2015. № 7: 32-43.*
2. *Байрашева В. К. Моделирование сахарного диабета и диабетической нефропатии в эксперименте // Современные проблемы науки и образования. 2015. Т. 4. С. 460(11). DOI 10.17513/spno.127-21024.*
3. *Байрашева В. К., Бабенко А. Ю., Дмитриев Ю. В. и др. Новая модель сахарного диабета 2 типа и диабетической нефропатии у крыс // Трансляционная медицина. 2016.№ 3(4). С. 44-55.*
4. *Бондарь И. А., Климонтов В. В. Ранние маркеры диабетической нефропатии // Клиническая нефрология. 2010. № 2. С. 60-65.*
5. *Кравчук Е. Н., Галагудза М. М. Применение метформина при сочетании ишемической болезни сердца и сахарного диабета 2 типа: механизмы действия и клиническая эффективность // Сахарный диабет. 2013. № 1. С. 5–14.*
6. *Моргунов Л. Ю. Плейотропные эффекты метформина // Исследования и практика в медицине. 2014. Т. 1. № 1. С.62-68.*
7. *Попова П. В., Рязанцева Е. М., Зазерская И. Е. и др. Восстановление менструальной функции в результате терапии метформином у женщин с синдромом поликистозных яичников // Проблемы женского здоровья. 2010. Т. 5. № 3. С. 11 – 17.*
8. *Попова П. В., Рязанцева Е. М., Зазерская И. Е. и др. Роль снижения массы тела и приема метформина в восстановлении менструальной функции у женщин с синдромом поликистозных яичников и избыточной массой тела // Проблемы эндокринологии. 2011. Т. 57. №2. С. 14-18.*
9. *Спасов А. А, Воронкова М. П., Снигур Г. Л, и др. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // Биомедицина. 2011. Т. 3. С. 12-18.*
10. *Шестакова М.В, Дедов И.И. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек. Москва: Медицинское информационное агентство, 2009. 482 с.*
11. *Alhaider A. A., Korashy H. M., Sayed-Ahmed M. M., et al. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression // Chem. Biol. Interact. 2011. Vol. 192. № 3. P. 233-242.*
12. *Bakoush O., Tencer J., Tapia J., et al. Higher urinary IgM excretion in type 2 diabetic nephropathy compared to type 1 diabetic nephropathy // Kidney Int. 2002. Vol. 61. № 1. P. 203-208.*
13. *Bayrasheva V. K., Grineva E. N., Babenko A. Y. et al. Nicotinamide-streptozotocin-induced type 2 diabetes in uninephrectomized high-fat-fed rats: a novel non-genetic rat model of diabetic nephropathy // European Heart Journal. 2015. Vol. 36 (suppl 1): P. 5236.*
14. *Ekström N., Schiöler L., Svensson A. M., et al. Effectiveness and safety of metformin in 51 675 patients with type 2 diabetes and different levels of renal function: a cohort study from the Swedish National Diabetes Register // B. M. J. Open. 2012. Vol. 2. № 4. pii: e001076. doi: 10.1136/bmjopen-2012-001076.*
15. *Fox C. S., Matsushita K., Woodward M., et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis // Lancet. 2012. Vol. 380. № 9854. P. 1662–1673.*
16. *Fu W. J., Xiong S. L., Fang Y. G., 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.*
17. *Giunti S., Barit D., Cooper M. E. Mechanisms of diabetic nephropathy. Role of hypertension // Hypertension. Vol. 48. № 4. P. 519-526.*
18. *Gunaratnam L., Bonventre J. V. HIF in kidney disease and development // J. Am. Soc. Nephrol. 2009. Vol. 20. № 9. P. 1877-1887.*
19. *Holman R. R., Paul S. K., Bethel M. A., et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes // N. Engl. J. Med. 2008. Vol. 359. № 15. P. 1577-1589.*
20. *Hosohata K., Ando H., Takeshita Y., et al. Urinary TIM-1 is a sensitive biomarker for the early stage of diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats // Diab. Vasc. Dis. Res. 2014. Vol. 11. № 4. P. 243-250.*
21. *Ishibashi Y., Matsui T., Takeuchi M., et al. Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced renal tubular cell injury by suppressing reactive oxygen species generation via reducing receptor for AGEs (RAGE) expression // Horm. Metab. Res. 2012. Vol. 44. № 12. P. 891-895.*
22. *Jefferson J. A., Shankland S. J., Pichler R. H. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint // Kidney Int. 2008. Vol. 74. № 1. P. 22-36.*
23. *Jin Q., Cheng J., Liu Y., et al. Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke // Brain Behav. Immun. 2014. Vol. 40. P. 131-142.*
24. *Kim J., Shon E., Kim C. S., et al. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin // Exp. Diabetes Res. 2012. 2012:210821.*
25. *Klachko D., Whaley-Connell A. Use of metformin in patients with kidney and cardiovascular diseases // Cardiorenal Med. 2011. Vol. 1. № 2. P. 87-95.*
26. *Kravchuk E., Grineva E., Bairamov A., et al. The effect of metformin on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the rat model of diabetes mellitus type II // Exp. Diabetes Res. 2011. 2011:907496.*
27. *Kunika K., Yamaoka T., Itakura M. Damage of charge-dependent renal tubular reabsorption causes diabetic microproteinuria // Diabetes Res. Clin. Pract. 1997. Vol. 36. № 1. P. 1-9.*
28. *Lachin J. M., Viberti G., Zinman B., et al. Renal function in type 2 diabetes with rosiglitazone, metformin, and glyburide monotherapy // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2011. Vol. 6. № 5. P. 1032-1040.*
29. *Lemley K.V., Blouch K., Abdullah I., et al. Glomerular permselectivity at the onset of nephropathy in type 2 diabetes mellitus // J. Am. Soc. Nephrol. 2000. Vol. 11. P. 2095–2105.*
30. *Mann J. F., Gerstein H. C., Yi Q. L., et al. Progression of renal insufficiency in type 2 diabetes with and without microalbuminuria: results of the Heart Outcomes and Prevention Evaluation (HOPE) randomized study // Am. J. Kidney Dis. 2003. Vol. 42. № 5. P. 936-942.*
31. *Manotham K., Tanaka T., Matsumoto M., et al. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia // Kidney Int. 2004. Vol. 65. № 3. P. 871-880.*
32. *Nakagawa S., Nishihara K., Miyata H., et al. Molecular markers of tubulointerstitial fibrosis and tubular cell damage in patients with chronic kidney disease // PLoS One. 2015. Vol. 10. № 8:e0136994. doi: 10.1371/journal.pone.0136994. eCollection 2015.*
33. *Peterson R. G, Jackson C. V., Zimmerman K., et al. Characterization of the ZDSD rat: a translational model for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes // J. Diabetes Res. 2015. 2015:487816.*

34. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group // Lancet. 1998. Vol. 352. No 9131. P. 854-865.

35. Schainuck L., Striker G. E., Cutler R. E., et al. Structural-functional correlations in renal disease: II. The correlations // Hum. Pathol. 1970. Vol. 1. P. 631–641.

36. Sowers K. M, Habibi J., Hayden M. R. Diabetic nephropathy and tubulointerstitial fibrosis in cardiometabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus // J. Cardiometab. Syndr. 2007. Vol. 2. № 2. P. 143-148.

37. Takiyama Y.., Harumi T., Watanabe J., et al. Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin a possible role of HIF-1α expression and oxygen metabolism // Diabetes. 2011. Vol. 60. № 3. P. 981-992.

38. Takiyama Y., Haneda M. Hypoxia in diabetic kidneys // Biomed. Res. Int. 2014. 2014:837421. doi: 10.1155/2014/837421.

39. Vallon V., Thomson S. C. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney // Annu. Rev. Physiol. 2012. Vol. 74. P. 351-375.

40. Zuurbier C. J., Demirci C., Koeman A., et al. Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells // J. Appl. Physiol. 2005. Vol. 99. P. 1471–1476.

UDK 616.61:616.379-008.64:612.086.2

Bayrasheva V. K.[1,2], Babenko A. Yu.[1,2], Dmitriev Yu. V.[1], Bairamov A. A.[1], Chefu S. G. [1,2], Shatalov I. S.[3], Arefieva A. N. [2], Pchelin I. Yu.[4], Hudiakova N. V. [2], Aliev P. N. [2], Grineva E. N. [1,2]

The role of metformin in the prevention of diabetic nephropathy in experimental type 2 diabetes

[1] Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia
[2] Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia
[3] Saint Petersburg national research University of Information, Technologies, Mechanics and Optics, Saint Petersburg, Russia
[4] Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia
e-mail: bayrasheva_med@mail.ru

Abstract

Introduction and purpose. **A number of landmark trials have demonstrated clear benefits of metformin therapy in the prevention of macrovascular outcomes. Nevertheless, there is a lack of robust evidence to suggest whether metformin therapy will have similar beneficial outcomes in one of the most serious type 2 diabetes-related renal microvascular complications known as diabetic nephropathy. The study aimed to evaluate the effects of ten-week metformin treatment on renal morphofunctional changes in rats with non-genetic type 2 diabetic nephropathy.**

Materials and methods. **Starting at 3 weeks after unilateral nephrectomy, adult male Wistar rats were fed the high-fat diet for 5 weeks, and then successively received nicotinamide (230 mg/kg) and streptozotocin (65 mg/kg) intraperitoneally in 15-min interval. .**

Results. **Starting at 11 weeks after confirmation of diabetes, metformin treatment did not attenuate routine renal dysfunction markers such as creatinine, creatinine clearance and albuminuria compared to placebo-treated diabetic group, and glomerulosclerosis index and glomerular expression of type IV collagen didn't significantly change either. Nevertheless, level of urinary kidney injury molecule-1, considered to be the marker of tubular damage in diabetes, was significantly lower in metformin-treated animals. Moreover, reduction of tubulointerstitial lesion tended to be significant.**

Conclusions. **Under conditions of diabetic nephropathy modeling, metformin has shown direct protective effects against diabetic tubular disturbance. To assess long-term renal outcomes of these findings, more pre-clinical studies and clinical trials are required.**

Keywords: *metformin, kidney, rat, diabetes mellitus type 2, diabetic nephropathy.*

References

1. Babenko A. Y. Bayrasheva V. K. Diabeticheskaya nefropatiya: zavisit li renoprotekciya ot vybora sakharosnizhayushchej terapii ? // Medicinskij sovet. 2015. № 7. S. 32-43. [In Russian].

2. Bayrasheva V. K. Modelirovanie sakharnogo diabeta i diabeticheskoj nefropatii v ehksperimente // Sovremennye problemi nauki I obrazovaniya. 2015. № 4. S. 460 (11). DOI 10.17513/spno.127-21024. [In Russian].

3. Bayrasheva V. K., Babenko A. Yu., Dmitriev Yu. V., i dr. Novaya model sakharnogo diabeta 2 tipa i diabeticheskoy nefropatii u krys // Translyacionnaya medicina. 2016. № 3(4). S. 44-55. [In Russian].

4. Bondar I. A., Klimontov V. V. Rannie markery diabeticheskoj nefropatii // Klinicheskaya nefrologiya. 2010. № 2 .S. 60-65. [In Russian].

5. Kravchuk E. N., Galagudza M. M. Primenenie metformina pri sochetanii ishemicheskoj bolezni serdca i sakharnogo diabeta 2 tipa: mekhanizmy dejstviya i klinicheskaya ehffektivnost // Sakharnyj diabet. 2013. № 1. S. 5-14. [In Russian].

6. Morgunov L.Yu. Plejotropnye ehffekty metformina. Issledovaniya i praktika v medicine. 2014. T. 1. № 1. S. 62-68. [In Russian].

7. Popova P. V., Ryazanceva E. M., Zazerskaya I. E. i dr. Vosstanovlenie menstrualnoj funkcii v rezultate terapii metforminom u zhenshchin s sindromom polikistoznykh yaichnikov // Problemy zhenskogo zdorovya. 2010. T. 5. № 3 S. 11-17. [In Russian].

8. Popova P. V., Ryazanceva E. M., Zazerskaya I. E. i dr. Rol snizheniya massy tela i priema metformina v vosstanovlenii menstrualnoy funkcii u zhenshchin s sindromom polikistoznykh yaichnikov i izbytochnoy massoy tela // Problemy ehndokrinologii. 2011. T. 57.№ 2. S. 14-18. [In Russian].

9. Spasov A. A., Voronkova M. P., Snigur G. L. i dr. EHksperimentalnaya model sakharnogo diabeta tipa 2 // Biomedicina. 2011. № 3. S. 12-18. [In Russian].

10. SHestakova M. V., Dedov I. I. Sakharnyj diabet i khronicheskaya bolezn pochek. Moskva: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2009. 482 s. [In Russian].

11. Alhaider A. A., Korashy H. M., Sayed-Ahmed M. M., et al. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression // Chem. Biol. Interact. 2011. Vol. 192. № 3. P. 233-242.

12. Bakoush O., Tencer J., Tapia J., et al. Higher urinary IgM excretion in type 2 diabetic nephropathy compared to type 1 diabetic nephropathy // Kidney Int. 2002. Vol. 61. № 1. P. 203-208.

13. Bayrasheva V. K., Grineva E. N., Babenko A. Y. et al. Nicotinamide-streptozotocin-induced type 2 diabetes inuninephrectomized high-fat-fed rats: a novel non-genetic rat model of diabetic nephropathy // European Heart Journal. 2015. Vol. 36 (suppl 1): P. 5236.

14. Ekström N., Schiöler L., Svensson A. M., et al. Effectiveness and safety of metformin in 51 675 patients with type 2 diabetes and different levels of renal function: a cohort study from the Swedish National Diabetes Register // B. M. J. Open. 2012. Vol. 2. № 4. pii: e001076. doi: 10.1136/bmjopen-2012-001076.

15. Fox C. S., Matsushita K., Woodward M., et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis // Lancet. 2012. Vol. 380. № 9854. P. 1662–1673.

16. Fu W. J., Xiong S. L., Fang Y. G., 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.

17. Giunti S., Barit D., Cooper M. E. Mechanisms of diabetic nephropathy. Role of hypertension // Hypertension. Vol. 48. № 4. P. 519-526.

18. Gunaratnam L., Bonventre J. V. HIF in kidney disease and development // J. Am. Soc. Nephrol. 2009. Vol. 20. № 9. P. 1877-1887.

19. Holman R. R., Paul S. K., Bethel M. A., et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes // N. Engl. J. Med. 2008. Vol. 359. № 15. P. 1577-1589.

20. Hosohata K., Ando H., Takeshita Y., et al. Urinary TIM-1 is a sensitive biomarker for the early stage of diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats // Diab. Vasc. Dis. Res. 2014. Vol. 11. № 4. P. 243-250.

21. Ishibashi Y., Matsui T., Takeuchi M., et al. Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced renal tubular cell injury by suppressing reactive oxygen species generation via reducing receptor for AGEs (RAGE) expression // Horm. Metab. Res. 2012. Vol. 44. № 12. P. 891-895.

22. Jefferson J. A., Shankland S. J., Pichler R. H. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint // Kidney Int. 2008. Vol. 74. № 1. P. 22-36.

23. Jin Q., Cheng J., Liu Y., et al. Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke // Brain Behav. Immun. 2014. Vol. 40. P. 131-142.

24. Kim J., Shon E., Kim C. S., et al. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin // Exp. Diabetes Res. 2012. 2012:210821.

25. Klachko D., Whaley-Connell A. Use of metformin in patients with kidney and cardiovascular diseases // Cardiorenal Med. 2011. Vol. 1. № 2. P. 87-95.

26. Kravchuk E., Grineva E., Bairamov A., et al. The effect of metformin on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the rat model of diabetes mellitus type II // Exp. Diabetes Res. 2011. 2011:907496.

27. Kunika K., Yamaoka T., Itakura M. Damage of charge-dependent renal tubular reabsorption causes diabetic microproteinuria // Diabetes Res. Clin. Pract. 1997. Vol. 36. № 1. P. 1-9.

28. Lachin J. M., Viberti G., Zinman B., et al. Renal function in type 2 diabetes with rosiglitazone, metformin, and glyburide monotherapy // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2011. Vol. 6. № 5. P. 1032-1040.

29. Lemley K.V., Blouch K., Abdullah I., et al. Glomerular permselectivity at the onset of nephropathy in type 2 diabetes mellitus // J. Am. Soc. Nephrol. 2000. Vol. 11. P. 2095–2105.

30. Mann J. F., Gerstein H. C., Yi Q. L., et al. Progression of renal insufficiency in type 2 diabetes with and without microalbuminuria: results of the Heart Outcomes and Prevention Evaluation (HOPE) randomized study // Am. J. Kidney Dis. 2003. Vol. 42. № 5. P. 936-942.

31. Manotham K., Tanaka T., Matsumoto M., et al. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia // Kidney Int. 2004. Vol. 65. № 3. P. 871-880.

32. Nakagawa S., Nishihara K., Miyata H., et al. Molecular markers of tubulointerstitial fibrosis and tubular cell damage in patients with chronic kidney disease // PLoS One. 2015. Vol. 10. № 8:e0136994. doi: 10.1371/journal.pone.0136994. eCollection 2015.

33. Peterson R. G, Jackson C. V., Zimmerman K., et al. Characterization of the ZDSD rat: a translational model for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes // J. Diabetes Res. 2015. 2015:487816.

34. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group // Lancet. 1998. Vol. 352. No 9131. P. 854-865.

35. Schainuck L., Striker G. E., Cutler R. E., et al. Structural-functional correlations in renal disease: II. The correlations // Hum. Pathol. 1970. Vol. 1. P. 631–641.

36. Sowers K. M, Habibi J., Hayden M. R. Diabetic nephropathy and tubulointerstitial fibrosis in cardiometabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus // J. Cardiometab. Syndr. 2007. Vol. 2. № 2. P. 143-148.

37. Takiyama Y.., Harumi T., Watanabe J., et al. Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin a possible role of HIF-1α expression and oxygen metabolism // Diabetes. 2011. Vol. 60. № 3. P. 981-992.

38. Takiyama Y., Haneda M. Hypoxia in diabetic kidneys // Biomed. Res. Int. 2014. 2014:837421. doi: 10.1155/2014/837421.

39. Vallon V., Thomson S. C. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney // Annu. Rev. Physiol. 2012. Vol. 74. P. 351-375.

40. Zuurbier C. J., Demirci C., Koeman A., et al. Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells // J. Appl. Physiol. 2005. Vol. 99. P. 1471–1476.