

© В.М.Ибрагимов, А.М.Алискандиев, М.М.Батюшин, И.В.Сарвилина, 2016  
УДК [ 616.61 : 61.001.57 ] – 032.4

*В.М. Ибрагимов<sup>1</sup>, А.М. Алискандиев<sup>2</sup>, М.М. Батюшин<sup>3</sup>, И.В. Сарвилина<sup>4</sup>*

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ МОЧИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИЕЙ I СТАДИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-го ТИПА

<sup>1</sup>Кафедра урологии и <sup>2</sup>кафедра факультетской и госпитальной педиатрии Дагестанской государственной медицинской академии, Махачкала, Россия, <sup>3</sup>кафедра внутренних болезней № 2 Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону, <sup>4</sup>Медицинский центр «Новомедицина», Ростов-на-Дону, Россия

*V.M. Ibragimov<sup>1</sup>, A.M. Aliskandiev<sup>2</sup>, M.M. Batiushin<sup>3</sup>, I.V. Sarvilina<sup>4</sup>*

## DIAGNOSTIC PROTEOMIC PROFILE OF URINE FROM PATIENTS WITH DIABETIC NEPHROPATHY STAGE I IN DIABETES MELLITUS TYPE 2

<sup>1</sup>Department of urology, <sup>2</sup>Department of faculty and hospital pediatrics у кафедра факультетской и госпитальной педиатрии Dagestan State Medical Academy Makhachkala, Russia, <sup>3</sup>Department of internal diseases № 2 Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, <sup>4</sup>Medical Centre "Novomeditina" Rostov-on-Don, Russia

### РЕФЕРАТ

**ВВЕДЕНИЕ.** Эпидемиология диабетической нефропатии (ДН) при сахарном диабете (СД) 2-го типа изучена недостаточно, время появления ДН определить сложно. **ЦЕЛЬ:** поиск молекулярных прогностических маркеров ДН 1 стадии у пациентов с СД 2 типа. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Мы верифицировали в исследовании пациентов с СД 2-го типа и ДН I стадии (n=42). В контрольную группу включено 30 здоровых лиц. Продолжительность СД составила 5,6 года. На этапе скрининга и сбора данных применялись стандартные методы идентификации ДН. Качественное и количественное молекулярное фенотипирование биообразцов мочи выполнено с помощью методов протеомики («MALDI-TOF-MS/MS, Ultraflex II», «Bruker», США). Данные о молекулярных взаимодействиях получены с помощью базы данных «STRING 10.0». Статистический анализ выполнен с применением пакета программ «Statistica 12.0» (Statsoft, Россия). **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Мы выявили новые биомаркеры ДН 1 стадии, которые могут быть использованы для создания неинвазивных диагностических тестов образцов мочи. Исследование внутриклеточных сигнальных путей, экспрессии, секреции и накопления молекул в экстрацеллюлярном матриксе является основой для разработки стратегий профилактики ДН.

**Ключевые слова:** диабетическая нефропатия, сахарный диабет 2 типа, протеомика, молекулярные маркеры.

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The epidemiology of diabetic nephropathy (DN) in type 2 diabetes mellitus (DM) is investigated insufficiently since precisely extremely difficult to determine the time of the DN beginning. **THE AIM:** to search of molecular prognostic markers of DN 1 stage in patients with type 2 DM. **PATIENTS AND METHODS.** We have verified DN 1 stage patients with type 2 DM (n=42) in study. Control group included 30 healthy persons. The duration of DM was 5,6 years. At the stage of data collection and screening are applied standard methods of DN identification. Qualitative and quantitative molecular phenotyping of urine processed with methods in proteomics (MALDI-TOF-MS/MS, Ultraflex II, «Bruker», USA). The data of the molecular interactions were received with STRING 10.0 database. Statistical analysis was performed using the software "Statistica 12.0" (Statsoft, Russia). **RESULTS.** We identified potentially new biomarkers of DN 1 stage which could be used to create a noninvasive, urine-based diagnostic tests. The research of signaling pathways and the molecules that influence expression, secretion and amassing of extracellular matrix may aid in strategies for the prophylaxis of DN.

**Key words:** diabetic nephropathy, type 2 diabetes mellitus, proteomics, molecular markers.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из главных причин смертности пациентов с сахарным диабетом (СД) 2-го типа является диабетическая нефропатия (ДН), которая приводит к развитию терминальной почечной недостаточности [1–5]. В России распространенность ДН

при СД 2-го типа в среднем составляет 8%, что ниже мировых показателей в 5 раз. Активное выявление пациентов с СД 2-го типа позволяет думать о том, что истинная распространенность ДН в различных регионах России может быть больше в 2–8 раз [2].

Хорошо известно, что ранняя идентификация пациентов, имеющих риск развития ДН, очень важна. Диагностические маркеры, которые сегодня применяются для этого, такие как экскре-

Батюшин М.М. Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29. Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Тел.: +7 918-501-88-01, E-mail: batjushin-m@rambler.ru

ция альбумина с мочой и скорость клубочковой фильтрации, подвержены существенной вариабельности [6], а также имеют невысокую прогностическую ценность [7]. Точные диагностические методы крайне важны как для разработки мер профилактики ДН, так и для детализации ее интимных механизмов [8]. Моча является интерактомом, который отражает молекулярную информацию о функционировании почек и урогенитального тракта [9]. Сегодня методы протеомики применяются для оценки профиля пептидов и белков у здоровых субъектов и для сравнения протеома мочи у пациентов с СД с наличием или отсутствием альбуминурии. Пациенты с СД без альбуминурии имеют отличающийся пептидный и белковый паттерн по сравнению с контролем, как и пациенты с альбуминурией демонстрируют индивидуальный полипептидный профиль.

Современные методы и технологии протеомного анализа позволяют обнаружить новые прогностические маркеры и исследовать патологические пути формирования ДН у пациентов с СД 2-го типа. Сегодня нам необходим прогресс в разработке и клиническом применении новых молекулярных скрининговых тестов, полученных в ходе популяционных исследований и отражающих ключевые геномно-протеомные взаимодействия, которые лежат в основе развития ДН у пациентов с СД 2-го типа.

Целью настоящего исследования явился поиск диагностического протеомного профиля мочи у пациентов с ДН I стадии (пренефропатия) при СД 2-го типа.

#### ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование являлось проспективным когортным сравнительным с параллельным дизайном. Исследование выполнено в соответствии с Хельсинской декларацией всемирной медицинской ассоциации (1964–2013) и заключением этических комитетов ГБОУ ВПО «Дагестанская государственная медицинская академия» МЗ РФ (г. Махачкала, Россия), ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» МЗ РФ (г. Ростов-на-Дону, Россия).

Обследовали 42 пациента с СД 2-го типа и ДН I стадии (пренефропатия) в соответствии с новой классификацией ДН, предложенной Объединенным комитетом по ДН [10]. Критериями включения в исследование были: СД 2-го типа, нормоальбуминурия (альбумин в моче  $<30$  мг/г креатинина), скорость клубочковой фильтрации (СКФ)  $>30$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Критерии исключения: микро- или ма-

кроальбуминурия, протеинурия, СКФ менее 60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Контрольная группа включала 30 практически здоровых лиц. Риски СД 2-го типа были оценены с помощью Финской шкалы оценки рисков СД 2-го типа [11]. Продолжительность СД 2-го типа составила 5,6 года, продолжительность терапии – 5 лет. Пациенты получали терапию противодиабетическими (глибенкламид, метформин, пиоглитазон, инсулин гларгин), антигипертензивными (амлодипин, валсартан), гиполипидемическими (фенофибрат) препаратами, антиагрегантами.

На этапе скрининга и сбора данных применяли стандартные методы выявления ДН и СД: оценка жалоб пациента, истории болезни, физикального статуса, амбулаторное мониторирование артериального давления, ЭКГ («ATES MEDICA», Италия–Россия), УЗИ почек (доплеровский спектр почечных артерий с оценкой эхогенности кортикального сегмента почек, «SonoAce R3, Samsung Medison», Южная Корея), общеклинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови и мочи («ELISA, Siemens 2000», Германия), оценка компенсации СД 2 типа на основе уровня HbA1c («Randox Laboratories Ltd.», Великобритания), коагулограмма («Instrumentation Laboratory», США), измерение соотношения альбумин/креатинин в моче, оценка функции почек – клубочковой фильтрации, эффективного почечного кровотока методом, предложенным H.Bazzak. Характеристика групп представлена в табл. 1.

Качественное молекулярное фенотипирование биообразцов (моча) выполняли с помощью методов протеомики: префракционирование, разделение белков с помощью стандартных наборов («MB-NIC C8 Kit, MB-IMAC Cu, MB-Wax Kit», «Bruker», США), время-пролетная матричная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией–ионизацией («MALDI-TOF-MS/MS, Ultraflex II», «Bruker», США). Масс-спектры регистрировали каждые 3 с в диапазоне m/z 350–3000. Отдельные сиквенсы были идентифицированы в системах «BLAST protein-protein» и в базе данных «Swissprot» для раздела «Homo sapiens» с проверкой идентифицированных белков в базе данных «MASCOT» («Matrix Science», Великобритания). Данные о межмолекулярных взаимодействиях и функциональной активности получены на основе базы данных «STRING 10.0».

Основываясь на данных стандартных методов идентификации ДН и качественного и количественного молекулярного фенотипирования биообразцов мочи, были предложены новые прогностические маркеры и молекулярные патологи-

ческие пути развития пренефропатии у пациентов с СД 2-го типа.

Статистический анализ полученных данных выполнен с помощью пакета программ «Statistica 12.0» («Statsoft», США). Результаты представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка средней. Статистическую значимость различий двух средних определяли с помощью t-критерия Стьюдента; частот –  $\chi^2$ -критерия Пирсона. Оценку силы взаимосвязи между количественными признаками проводили с помощью коэффициента корреляции (r) Пирсона. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий и связей отвергали при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании мы верифицировали пациентов с СД 2-го типа и ДН I стадии (n=42). Клинико-

анамнестическая характеристика пациентов с СД 2-го типа и ДН представлена в табл. 1. Параметры коагулограммы, общеклинического анализа крови, уровни мочевой кислоты и калия в сыворотке крови находились в пределах референсных значений у пациентов с СД 2-го типа и ДН I стадии. У 35 пациентов с СД 2-го типа и ДН I стадии выявлено достоверное увеличение индексов резистивности для аркуатных или междольковых артерий почек (RI: КГ –  $0,60 \pm 0,04$ ; группа 1 –  $0,81 \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ ).

Мы отметили достоверное повышение уровней среднего дневного и ночного САД и ДАД, ЧСС (среднее дневное САД: КГ –  $115,2 \pm 3,1$  мм рт. ст., группа 1 –  $145,4 \pm 4,1$  мм рт. ст.,  $p < 0,01$ ; среднее дневное ДАД: КГ –  $66,7 \pm 2,1$  мм рт. ст., группа 1 –  $82,0 \pm 2,8$  мм рт. ст.,  $p < 0,001$ ; среднее ночное САД: КГ –  $115,4 \pm 1,8$  мм рт. ст., группа 1 –  $129,4 \pm 2,6$  мм

Таблица 1

### Клинико-анамнестическая характеристика пациентов с ДН I стадии и здоровых лиц контрольной группы

| Параметр                                                                                                                                   | Группа 1 (n=42)  | КГ <sup>1</sup> (n=30) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------|
| Пол (мужчина/женщина), n <sup>2</sup>                                                                                                      | 24/18            | 14/16                  |
| Возраст, годы                                                                                                                              | $59,2 \pm 2,5$   | $59,5 \pm 1,7$         |
| Масса тела, кг                                                                                                                             | $85,5 \pm 1,7^*$ | $75,6 \pm 1,2$         |
| Рост, см                                                                                                                                   | $171,2 \pm 1,7$  | $170,5 \pm 1,6$        |
| ИМТ <sup>3</sup> , кг/м <sup>2</sup>                                                                                                       | $31,4 \pm 1,2^*$ | $26,1 \pm 0,8$         |
| Продолжительность СД 2-го типа, годы                                                                                                       | $5,6 \pm 0,5$    | -                      |
| <b>Факторы риска СД<sup>4</sup> 2-го типа (общий риск по шкале):</b>                                                                       |                  |                        |
| низкий (< 7)                                                                                                                               | -                | 26                     |
| незначительно повышенный (7–11)                                                                                                            | 12               | 4                      |
| умеренный (12–14)                                                                                                                          | 19               | -                      |
| высокий (15–20)                                                                                                                            | 7                | -                      |
| очень высокий (>20)                                                                                                                        | 4                | -                      |
| <b>Степень метаболической компенсации:</b>                                                                                                 |                  |                        |
| HbA1c <sup>5</sup> < 9% (хорошая компенсация)                                                                                              | 40               | -                      |
| HbA1c = 9–10% (удовлетворительная компенсация)                                                                                             | 2                | -                      |
| HbA1c > 10% (плохая компенсация)                                                                                                           | -                | -                      |
| <b>Стадия ДН<sup>6</sup> (альбумин в моче, мг/г Cr<sup>7</sup>, или белок в моче, г/г Cr, СГФ<sup>8</sup>, мл/мин/1.73 м<sup>2</sup>):</b> |                  |                        |
| пренефропатия (нормоальбуминурия, альбумин в моче < 30 мг/г креатинина)                                                                    | 42               | -                      |
| <b>Данные амбулаторного мониторингирования уровня АД (JNC<sup>7</sup>):</b>                                                                |                  |                        |
| Нормальное (САД <sup>10</sup> =90–119 мм рт. ст., ДАД <sup>11</sup> =60–79 мм рт. ст.)                                                     | 4                | 30                     |
| Высокое нормальное (прегипертензия)<br>(САД=120–139 мм рт. ст., ДАД=80–89 мм рт. ст.)                                                      | 28               | -                      |
| Стадия I гипертензии<br>(САД=140–159 мм рт. ст., ДАД=90–99 мм рт. ст.)                                                                     | 8                | -                      |
| Стадия II гипертензии<br>(САД=160–179 мм рт. ст., ДАД=100–109 мм рт. ст.)                                                                  | 2                | -                      |
| Стадия 3 гипертензии<br>(САД= $\geq 180$ мм рт. ст., ДАД= $\geq 110$ мм рт. ст.)                                                           | -                | -                      |
| <b>Стадии ретинопатии:</b>                                                                                                                 |                  |                        |
| легкая непролиферативная ретинопатия                                                                                                       | 12               | -                      |
| умеренная непролиферативная ретинопатия                                                                                                    | 28               | -                      |
| выраженная непролиферативная ретинопатия                                                                                                   | 2                | -                      |
| пролиферативная диабетическая                                                                                                              | -                | -                      |

Примечание. <sup>1</sup> – контрольная группа; <sup>2</sup>n – количество пациентов; <sup>3</sup>ИМТ – индекс массы тела, <sup>4</sup>СД – сахарный диабет; <sup>5</sup>HbA1c – гликозилированный гемоглобин; <sup>6</sup>ДН – диабетическая нефропатия; <sup>7</sup>Cr – креатинин; <sup>8</sup>СГФ – скорость клубочковой фильтрации; <sup>9</sup>JNC7 – доклад Объединенного Национального Комитета по профилактике, выявлению, оценке и лечению высокого артериального давления (2003); <sup>10</sup>САД – систолическое артериальное давление; <sup>11</sup>ДАД – диастолическое артериальное давление; различия по t-критерию Стьюдента в группе 1 КГ: ` нет различий; \*  $p < 0,05$ .

рт. ст.,  $p < 0,01$ ; среднее ночное ДАД: КГ –  $66,8 \pm 1,4$  мм рт. ст., группа 1 –  $81,5 \pm 1,7$  мм рт. ст.,  $p < 0,01$ ; ЧСС: КГ –  $79,5 \pm 1,3$  уд/мин, группа 1 –  $85,3 \pm 1,5$  уд/мин,  $p < 0,05$ ) в группе пациентов с СД 2-го типа и пренефропатией по сравнению с КГ здоровых лиц.

Одновременно выявлена высокая экспрессия пептидов и белков мочи, отражающих прогрессирование эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) и изменения в экстрацеллюлярном матриксе (ЭМЦ) почек у пациентов с СД 2-го типа и ДН I стадии.

Качественный протеомный анализ способствовал выявлению различий в составе пептидов и белков мочи у пациентов с ДН I стадии в сравнении с КГ у здоровых лиц. В табл. 2 представлен анализ функциональной активности каждого пептида/белка, продемонстрировавший необходимость дальнейших исследований и разработки молекулярной патогенетической схемы формирования ключевых звеньев ЭМТ и изменений в ЭЦМ почек при ДН в условиях СД 2-го типа.

При биоинформационном анализе были выявлены молекулы-участницы универсальных путей возникновения и развития ДН, а также их межмолекулярные взаимодействия.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в ходе исследования данные стандартных инструментальных и лабораторных ме-

тодов исследования не способствовали раннему выявлению ДН у пациентов с СД 2 типа. Качественный и количественный протеомный анализ позволил обнаружить увеличение концентрации пептидов и белков в моче с определенными биологическими функциями и имеющими различную локализацию в интра- и экстрацеллюлярном пространстве у пациентов с СД 2-го типа и ДН I стадии. Можно думать, что эти изменения отражают типичные морфологические особенности процесса ЭМТ: утолщение базальных мембран и увеличение гломерулярного мезангиального матрикса, расширение тубулоинтерстициального пространства вследствие увеличения ЭЦМ.

Церулоплазмин, в отличие от альбумина, имеет более высокие молекулярную массу, отрицательный заряд и изоэлектрическую точку 4,4 (кислый белок) [12]. Мы предполагаем, что высокая экспрессия церулоплазмينا в образцах мочи у пациентов с ДН I стадии в сравнении с контролем может быть связана либо с изменением заряда базальной мембраны гломерул, либо вследствие нарушения единства гломерулярного барьера при неизменной тубулярной функции. Вероятно, церулоплазмин является маркером поражения гломерул почек при ДН в самой ее ранней стадии, но необходимы дальнейшие исследования для подтверждения этого факта.

Е-кадгерин экспрессирован в мембране и цитоплазме почечных тубулярных эпителиальных

Таблица 2

### Качественный анализ белкового профиля мочи у пациентов с ДН I стадии и здоровых лиц

| № | Наименование пептида/белка              | Группа 1 (n <sup>1</sup> =42)               | КГ <sup>2</sup> (n=30) | MW <sup>3</sup> , Да <sup>3</sup> | Функциональная активность пептида/белка                                                                                                                                    |
|---|-----------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ | 18 <sup>(<math>\varphi^*</math>=3,78)</sup> | 2                      | 44 341                            | Профибротическая и противовоспалительная активность, регуляция тубулярной ЭМТ <sup>5</sup>                                                                                 |
| 2 | Е-кадгерин                              | 22 <sup>(<math>\varphi^*</math>=5,24)</sup> | 1                      | 97 456                            | Регуляция тубулярной ЭМТ; поддержание эпителиальной целостности, клеточного фенотипа; прогрессирование фиброза в почечной ткани                                            |
| 3 | Цистатин С                              | 15 <sup>(<math>\varphi^*</math>=3,83)</sup> | 1                      | 15 799                            | Ингибитор цистеиновой протеиназы, биомаркер поражения гломерулярного аппарата                                                                                              |
| 4 | Матриксная металло-протеиназа 9         | 8 <sup>(<math>\varphi^*</math>=2,24)</sup>  | 1                      | 78 458                            | Потенциальный регулятор тубулярной ЭМТ и потери синдеканов                                                                                                                 |
| 5 | NGAL                                    | 10 <sup>(<math>\varphi^*</math>=2,73)</sup> | 1                      | 22 588                            | Обеспечивает компенсаторный механизм, противостоящий внутриклеточному оксидативному стрессу и комплемент-индуцированному апоптозу                                          |
| 6 | Церулоплазмин                           | 12 <sup>(<math>\varphi^*</math>=3,19)</sup> | 1                      | 122 205                           | Биомаркер поражения гломерулярного аппарата                                                                                                                                |
| 7 | Пододцин                                | 23 <sup>(<math>\varphi^*</math>=5,44)</sup> | 1                      | 42 201                            | Поддерживает функциональную целостность клеток, регулируя PI3K/AKT-сигнальный путь                                                                                         |
| 8 | Макрофагальный белок хемоаттракции-1    | 11 <sup>(<math>\varphi^*</math>=2,97)</sup> | 1                      | 2583                              | Регулирует активность моноцитов, Т-клеток памяти, NK <sup>7</sup> -клеток; увеличивает продукцию ФНО $\alpha$ <sup>8</sup> и ИЛ-6 <sup>9</sup> в пораженной почечной ткани |

Примечание. n<sup>1</sup> – количество пациентов с экспрессией пептида/белка; <sup>2</sup>КГ – контрольная группа; <sup>3</sup>MW – молекулярная масса; <sup>4</sup>Да – дальтон; <sup>5</sup> $\varphi^*$  – значения критерия Фишера в группе 1/КГ; <sup>6</sup>ЭМТ – эпителиально-мезенхимальная трансформация; <sup>7</sup>PI3K/AKT – внутриклеточный сигнальный путь ферментов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), киназы AKT; <sup>8</sup>NK – естественные киллеры; <sup>9</sup>ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа; <sup>10</sup>ИЛ-6 – интерлейкин 6; \*\*\*  $p < 0,001$ , вероятность различий по t-критерию Стьюдента в группе 1/КГ.

клеток, и отмечено снижение его синтеза здесь при ДН I стадии по сравнению с контролем. Е-кадгерин идентифицирован как маркер, связанный с ДН I стадии. Мы выявили высокое содержание в моче цистатина С – маркера тубулярного повреждения, связанного с возникновением и дальнейшим прогрессированием ДН. У здоровых лиц цистатин С свободно фильтруется гломерулами почек и весь реабсорбируется в проксимальных канальцах. Увеличение концентрации цистатина С в моче позволяет считать его маркером почечной тубулярной дисфункции [13,14].

Полученные нами данные подтверждают, что высокая концентрация в моче аутокринных факторов, в том числе, ТФР  $\beta$ 1, макрофагального фактора хемоаттракции-1 и NGAL, связана с развитием ДН. Аутокринная сигнальная сеть может стимулировать формирование гипертрофии клубочков, расширения мезангиального матрикса и дистрофии проксимальных канальцев. ТФР  $\beta$ 1, который активирует киназу рецептора 1 к ТФР  $\beta$ , фосфорилирует рецептор-регулируемые Smads, Smad2 и Smad3, олигомерный комплекс со Smad4 и таргетную генетическую транскрипцию, включающую Smad7, рассматривается как ключевой медиатор в патогенезе почечного фиброза [15,16]. Сывороточный NGAL фильтруется через гломерулы и полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах посредством мультилигандного белкового переносчика мегалина в физиологических условиях. Поврежденные тубулярные клетки могут активно продуцировать связанный с желатиной липокалин нейтрофилов в качестве компенсаторного механизма против оксидативного стресса и комплемент-индуцированного апоптоза в клетках. Вероятно, при ДН увеличение концентрации NGAL в моче является результирующей повреждения в гломерулах и тубулярных клетках. Макрофагальный фактор хемоаттракции-1 регулирует миграцию и инфильтрацию моноцитов, Т-лимфоцитов памяти, естественных киллеров (NK) в почечной ткани пациентов с ДН.

Мы обнаружили активацию в моче ММП9. Этот факт может быть связан с эксцессивным ее накоплением в ЭМЦ, что приводит к развитию ДН. ММП9 ремоделирует ЭМЦ на самых ранних стадиях ДН [17].

Появление в моче специфических белков подоцитов также можно рассматривать в качестве ранних проявлений ДН. Подоциты помогают поддерживать гломерулярный фильтрационный барьер и защищают от потери белка. Появление подоцина в моче запускает процесс гломерулосклероза по-

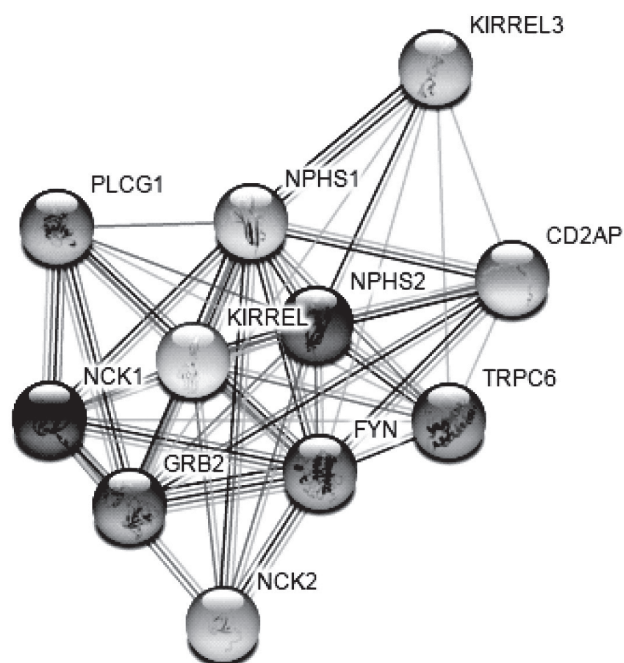


Схема межмолекулярных взаимодействий подоцина. NPHS2 – идиопатический стероид-резистентный белок нефроза 2 (подоцин); NPHS1 – белок нефроза 1, врожденный, финский тип; CD2AP – CD2-связанный белок; KIRREL – нефрин; TRPC6 – член 6-го подсемейства C-рецепторов катионных каналов; NCK2 – адапторный белок NCK 2; FYN – FYN-онкоген, связанный с генами SRC, FGR, YES; KIRREL3 – нефрин 3; NCK1 – адапторный белок NCK1; GRB2 – белок 2, связывающий рецептор фактора роста; PLCG1 – гамма-1 субъединица фосфолипазы C.

средством увеличения синехий между подоцитами и базальной мембраной гломерул. Подоцин взаимодействует с PI3K/АКТ-сигнальным патологическим каскадом, обеспечивая функциональное единство. Каждая молекула белка в функциональной группе взаимодействует с другими молекулами белков. Пример межмолекулярных взаимодействий подоцина представлен на рисунке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы идентифицировали новые биомаркеры ДН I стадии при СД 2-го типа, позволяющие развивать неинвазивные диагностические тесты для мочи с целью раннего выявления патологии. Динамика протеомной карты мочи у пациентов с ДН I стадии помогает детализировать молекулярный механизм возникновения и развития ДН. Исследование сигнальных патологических путей и молекул, синтезируемых, секретируемых и формирующих ЭЦМ, может способствовать разработке новых методов профилактики ДН.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. International Diabetes Federation, Diabetes Atlas Fifth Edition, International Diabetes Federation, Brussels, Belgium,

2011, 345

2. Шестакова МВ, Шамхалова МШ. Диабетическая нефропатия: клиника, диагностика, терапия / Под ред. ИИ Дедова М., 2009: 27 [Shestakova MV, Shamhalova MSh. Diabeticheskaya nefropatiya: klinika, diagnostika, terapiya / Pod redaktsei Dedova II. M., 2009: 27]

3. Смирнов АВ, Добронравов ВА, Кисина АА и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению диабетической нефропатии. *Нефрология* 2015; 19(1): 67-77 [Smirnov AV, Dobronravov VA, Kisina AA i dr. Clinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniiu diabeticheskoi nefropatii. *Nefrologiia* 2015; 19(1): 67-77]

4. Shlipak M. Diabetic nephropathy. *BMJ Clin Evid* 2009; 06.06.

5. KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update. *Am J Kidney Dis* 2012; 60(5):850-886

6. Smulders Y, Slaats E, Rakic M et al. Short-term variability and sampling distribution of various parameters of urinary albumin excretion in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Lab Clin Med* 1998; 132:39-46

7. T. Fiseha Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Biomark Res* 2015; 3:16-21

8. Alkhalaf A, Zurbig P, Bakker S et al. For the PREDICTIONS Group «Multicentric Validation of Proteomic Biomarkers in Urine Specific for Diabetic Nephropathy». *PLoS ONE* 2010; 5(10):13421

9. Гасанов МЗ, Батюшин ММ, Терентьев ВП, Садовнича НА. Протеомное исследование мочи у пациентов с гломерулонефритом и раком почки. *Нефрология* 2013; 5:75-82 [Gasanov MZ, Batiushin MM, Terent'ev VP, Sadovnichaya NA. Proteomnoe issledovanie mochi u patciентов s glomerulonefritom i rakom pochki. *Nefrologiia* 2013; 5:75-82]

10. Haneda M, Utsunomiya K, Koya D et al. Joint Committee on Diabetic Nephropathy. A new Classification of Diabetic Nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Investig* 2015; 6(2):242-246

11. Lindström J, Tuomilehto J. The diabetes risk score: a practical tool to predict type 2 diabetes risk. *Diabetes Care* 2003; 26 (3):725-731

12. Yamazaki M, Ito S, Usami A et al. Urinary excretion rate of ceruloplasmin in non-insulin-dependent diabetic patients with different stages of nephropathy. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 681-687

13. Randers E, Erlandsen E, Pedersen O et al. Serum cystatin C as an endogenous parameter of the renal function in patients with normal to moderately impaired kidney function. *Clin Nephrol* 2000; 54:203-209

14. Kim S, Song S, Kim I, Jeon Y. Urinary Cystatin C and Tubular Proteinuria Predict Progression of Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* 2013; 36(3): 656-661

15. Miyazono K. TGF- $\beta$  signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11(1-2):15-22

16. Shaker O, Sadik N. Transforming growth factor beta 1 and monocyte chemoattractant protein-1 as prognostic markers of diabetic nephropathy. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32(10):1089-1096

17. Kolset S, Reinholt F, Jenssen T. Diabetic Nephropathy and Extracellular Matrix. *J Histochem Cytochem* 2012; 60(12): 976-986

#### Сведения об авторах:

Проф. Батюшин Михаил Михайлович

Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра внутренних болезней № 2, д-р мед. наук. Тел.: +7 918-501-88-01, E-mail: batjushin-m@rambler.ru

Prof. Mikhail M. Batiushin, MD PhD DMedSci

Affiliations: Russia, 344022, Rostov-on-Don, the lane Nakhichevsky, 29. Rostov State Medical University, Department of internal diseases № 2, Phone: +7 918-501-88-01, E-mail: batjushin-m@rambler.ru

Проф. Алискандиев Алаудин Магомедович

Россия, 367015, Республика Дагестан, г. Махачкала, пл. Ленина, д. 1. Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования, «Дагестанская государственная медицинская академия» МЗ РФ, кафедра факультетской и госпитальной педиатрии, зав. кафедрой. E-mail: dgma@list.ru

Prof. Alaudin M. Aliskandiev, MD, PhD, DMedSci

Affiliations: Russia, 367015, Republic of Dagestan, Makhachkala, Lenin sq. 1. Dagestan State Medical Academy, Department of faculty and hospital pediatrics, chair. E-mail: dgma@list.ru

Ибрагимов Вагиф Магомедович

Россия, 367015, Республика Дагестан, г. Махачкала, пл. Ленина, д. 1. Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования, «Дагестанская государственная медицинская академия» МЗ РФ, кафедра урологии, зав. кафедрой, канд. мед. наук. E-mail: dgma@list.ru

Vagif M. Ibragimov MD, PhD

Affiliations: Russia, 367015, Republic of Dagestan, Makhachkala, Lenin sq. 1. Dagestan State Medical Academy, Department urology, chair. E-mail: dgma@list.ru

Сарвилина Ирина Владиславовна

Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Социалистическая, д. 74, офис 1030, ООО «Медицинский центр «Новомедицина», главный врач, д-р мед. наук, профессор клинический фармаколог. E-mail: isarvilina@mail.ru

Irina V. Sarvilina, MD, PhD, DMedSci

Affiliations: Russia, Rostov-on-Don, Sotsialisticheskaya str, 74, office 1030, LLC "Medical Centre "Novomeditsina", General Director, Chief physician clinical pharmacologist. E-mail: isarvilina@mail.ru

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Поступила в редакцию: 07.04.2016 г.

Принята в печать: 30.06.2016 г.