

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ФИЛИНОВА СВЕТЛАНА ОЛЕГОВНА

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ
ОКСИДАТИВНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ
(экспериментальное исследование)

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент Жариков Александр Юрьевич

Барнаул – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Диабетическая нефропатия. Эпидемиология, этиология, патогенез (Современные представления)	13
1.1.1 Подоцитопатия	14
1.1.2 Предполагаемые механизмы оксидативного повреждения почек и гибели подоцитов	21
1.2 Современные подходы к лечению диабетической нефропатии	27
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1 Стрептозотоциновая модель сахарного диабета	34
2.2 Экспериментальные животные	35
2.3 Этапы исследования и их дизайн	36
2.3.1 Этап №1 – Моделирование экспериментального сахарного диабета...	36
2.3.2 Этап №2 – Изучение патогенетически обоснованного влияния лекарственных препаратов на оксидативное повреждение и экскреторную функцию почек при экспериментальном сахарном диабете	40
2.4 Лекарственные препараты и обоснование их использования	42
2.5 Определение показателей экскреторной функции почек	44
2.6 Определение показателей развития оксидативного стресса в почках	46
2.7 Проведение морфологических исследований почек крыс	48
2.8 Статистическая обработка результатов исследования	49
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1 Моделирование экспериментального сахарного диабета и изучение функции почек	50
3.1.1 Биохимические и морфологические признаки повреждения почек при четырёхнедельном экспериментальном сахарном диабете	50

3.1.2 Сравнение биохимических и морфологических признаков повреждения почек при четырехнедельном и восьмимесячном экспериментальном сахарном диабете	63
3.2 Изучение патогенетически обоснованного влияния лекарственных препаратов на оксидативное повреждение и экскреторную функцию почек при экспериментальном сахарном диабете	67
3.2.1 Изучение влияния прямого антиоксиданта α -токоферола ацетата на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете	67
3.2.2 Изучение влияния блокатора минералокортикоидных рецепторов эплеренона на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете	74
3.2.3 Изучение влияния ингибитора образования конечных продуктов гликирования карнозина на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	87
ВЫВОДЫ	97
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	99

ВВЕДЕНИЕ

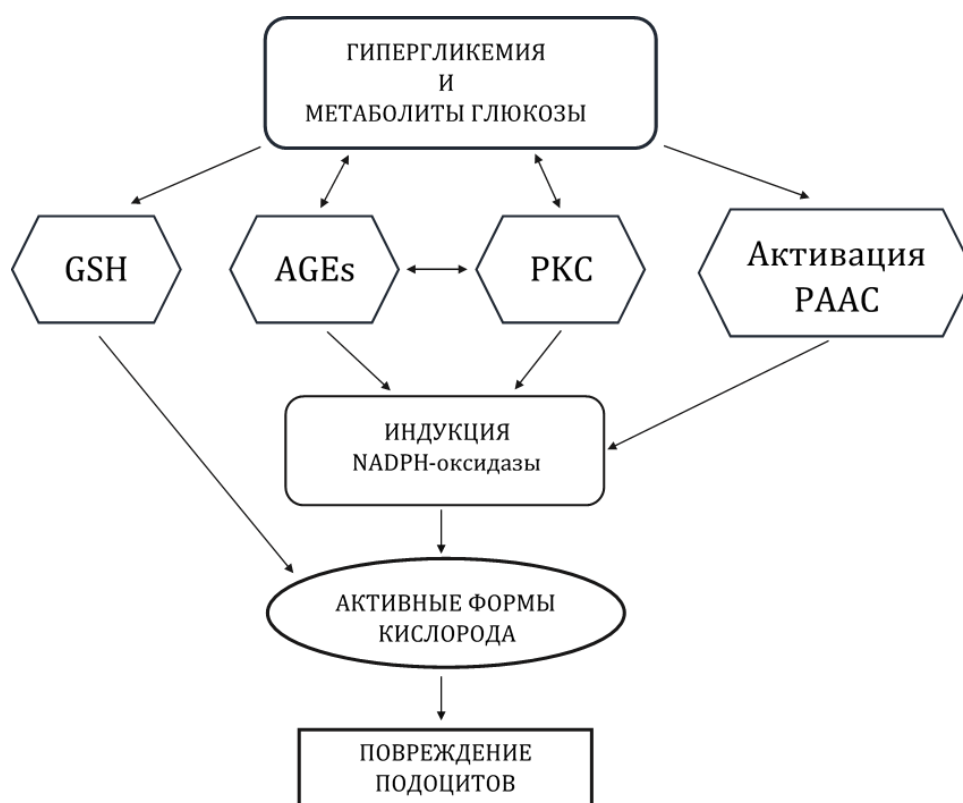
Актуальность темы исследования. Диабетическая нефропатия (ДН) – одно из наиболее распространенных и тяжелых осложнений сахарного диабета (СД). По современным данным, у 30-40% больных СД развивается ДН, которая является лидирующей причиной терминальной почечной недостаточности и 3-й в ряду главных причин смертности от СД [2,6,8,21,35,160]. Профилактика и эффективная терапия ДН на ее ранних стадиях может способствовать продлению и сохранению качества жизни больных, страдающих СД. В этой связи наряду с использованием базовой сахароснижающей терапии при СД высокую актуальность сохраняет разработка и внедрение новых направлений таргетного фармакологического воздействия на внутриренальные мишени патогенеза ДН.

Следует отметить, что патогенез ДН очень сложен и до сих пор не до конца изучен, что приводит к плохим результатам лечения. Было показано, что стандартная терапия со строгим контролем уровня сахара в крови и артериального давления не способна остановить прогрессирование ДН до терминальной стадии почечной недостаточности [26] и смертность, связанную с ДН [95]. Улучшение понимания и изучение патогенетических механизмов ДН имеет важное значение для разработки новых стратегий лечения ДН.

Важная патогенетическая роль оксидативного стресса в развитии диабетической нефропатии сегодня общепризнана [133,148,184]. Активация свободнорадикального окисления (СРО) в почках на фоне сахарного диабета показана во многих работах. Однако механизмы развития оксидативного повреждения почечного клубочка довольно разнообразны. Они могут быть прямые и опосредованные (Рисунок 1).

Принято считать, что в условиях сахарного диабета глюкоза и ее метаболиты в моче могут напрямую подавлять активность клеточных антиоксидантов, таких как глутатион [34]. Кроме того, активация СРО может происходить и опосредованно. Так, например, глюкоза может провоцировать образование из ренальных белков конечных продуктов гликирования, которые, как известно, являются мощнейшими

оксидантами при сахарном диабете [34]. Кроме того, может активироваться ренин-ангиотензин-альдостероновая система [34]. Эти 2 механизма способствуют индукции NADPH-оксидазы с последующим изменением функций митохондрий и образованием активных форм кислорода (АФК) [34,222]. Под влиянием активных форм кислорода, происходят функциональные и морфологические изменения подоцитов, в основном включая гипертрофию подоцитов, эпителиально-мезенхимальную трансдифференцировку, отслойку подоцитов и апоптоз подоцитов, что приводит к нарушению барьерной функции почечного клубочка и развитию протеинурии [121].



Примечание: GSH – глутатион, AGEs – конечные продукты гликирования, PKC – протеинкиназа C, РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система.

Рисунок 1 – Механизмы развития оксидативного повреждения почек при сахарном диабете (по Bhatti A.B. и Usman M. [32])

Таким образом, по современным представлениям можно выделить 3 основных механизма оксидативного повреждения почек при сахарном диабете:

1. Прямое прооксидантное действие глюкозы и ее метаболитов

2. Активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы

3. Образование конечных продуктов гликирования

Однако остается открытым вопрос – подавление какого из трех вышеперечисленных механизмов внутрипочечной оксидации может оказаться наиболее эффективным в лечении ДН? Решение данного вопроса будет способствовать повышению эффективности применения уже существующих лекарственных препаратов и разработке новых более специфических средств с патогенетически обоснованной направленностью действия в лечении ДН.

Настоящее исследование посвящено экспериментальной оценке эффективности коррекции вышеуказанных механизмов оксидативного повреждения почек. Для этого в качестве фармакологических «инструментов» были выбраны препараты с направленным типом действием:

- α -токоферола ацетат – прямой антиоксидант, действие направлено на ингибирование прямого прооксидантного действия глюкозы и ее метаболитов;

- эплеренон – блокатор минералокортикоидных рецепторов, действие направлено на ослабление активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы;

- карнозин – действие направлено на ингибирование образования конечных продуктов гликирования.

Степень разработанности темы исследования.

Применение антиоксидантов в терапии диабетической нефропатии широко обсуждается. В то же время имеющиеся сведения порой довольно противоречивы. Так, результаты 12 исследований, включавших 1461 участника, из которых 882 находились под наблюдениями во время лечения антиоксидантами, показали, что несмотря на определенные положительные изменения в общей картине протекания нефропатии, не было выявлено связи между изменением соотношения альбумина в моче и креатинина в сыворотке крови, нежелательными явлениями и частотой смерти при лечении антиоксидантами [99]. В другом исследовании показано, что антиоксиданты могут быть эффективны при трех наиболее тяжелых осложнений сахарного диабета, в том числе – диабетической нефропатии [253].

Активно исследуется антиоксидантная активность при диабетической нефропатии различных растительных антиоксидантов: полифенолов, ресверетрола, кверцетина и др. [97,183,185]. В то же время хорошо известно, что вещества растительного происхождения обладают комплексными свойствами, обуславливающих лечебный эффект [155]. Данных о наиболее эффективных направлениях патогенетически обоснованного фармакологического воздействия на механизмы оксидативного повреждения почек при сахарном диабете и разработанных на их основе новых лекарственных веществах для антиоксидантной терапии диабетической нефропатии в доступной литературе не встречается.

Цель исследования: Оценить эффективность патогенетически обоснованной фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек при экспериментальном сахарном диабете путем применения α -токоферола ацетата, эплеренона и карнозина.

Задачи исследования:

1. Изучить биохимические и морфологические признаки оксидативного повреждения почек в условиях экспериментального сахарного диабета для последующей оценки эффективности фармакологической коррекции: активность процесса свободнорадикального окисления в почках, уровень в моче глюкозы, белка и креатинина, структурное и функциональное состояние почечного клубочка.

2. Изучить эффективность применения прямого антиоксиданта α -токоферола ацетата для коррекции повреждения почек при экспериментальном сахарном диабете.

3. Оценить влияние блокатора минералокортикоидных рецепторов эплеренона на биохимические и морфологические признаки повреждения почек при экспериментальном сахарном диабете.

4. Изучить нефропротекторную активность карнозина в качестве ингибитора образования конечных продуктов гликирования в почках при экспериментальном сахарном диабете.

Научная новизна. В проведенном исследовании впервые изучена эффективность патогенетически обоснованной фармакологической коррекции основных механизмов развития оксидативного повреждения почек при экспериментальном сахарном диабете.

Впервые обнаружено, что прямое антиоксидантное действие α -токоферола ацетата на глюкозу и ее метаболиты в почках приводит к выраженному ослаблению активности свободнорадикального окисления (пятикратное снижение концентрации ТБРП относительно контрольной группы), однако при этом нефропротекторный эффект не возникает: показатели экскреторной функции почек и патоморфологическая картина нефропатии не отличались от контрольной группы. Это указывает на то, что подавление прямого компонента оксидативного эффекта глюкозы и продуктов ее метаболизма недостаточно для нормализации структуры и функции почечного фильтрационного барьера при сахарном диабете, а опосредованные механизмы оксидации вносят гораздо более существенный вклад в развитие нефропатии и более предпочтительны в качестве мишеней для фармакологической коррекции.

Впервые установлено, что нефропротекторное действие ингибитора минералокортикоидных рецепторов эплеренона и модуляция активности процесса РААС-ассоциированного свободнорадикального окисления в почках между собой не связаны. На фоне применения эплеренона существенно ослаблялась протеинурия и улучшалась патоморфологическая картина нефропатии, но при этом выраженность оксидативного стресса в почках не снижалась, а наоборот, увеличивалась. Это свидетельствует о том, что нефропротекторный эффект при ингибировании минералокортикоидных рецепторов возникает вследствие ослабления геномных эффектов альдостерона, а увеличение активности процесса свободнорадикального окисления в почках в этих условиях возникает из-за компенсаторного увеличения продукции альдостерона и усиления его негеномных мембранных эффектов.

В проведенных экспериментах впервые показана совокупность благоприятных изменений в картине нефропатии на фоне экспериментального

сахарного диабета при применении карнозина. Было зафиксировано ослабление оксидативного стресса в почках, снижение концентрации белка в моче, улучшение патоморфологической картины нефропатии, особенно в отношении подоцитов (почти двукратное увеличение по сравнению с контрольной группой).

По результатам проведенного исследования получены новые данные, которые заключаются в том, что наиболее перспективным направлением фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек при сахарном диабете является ингибирование образования конечных продуктов гликирования.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в появлении новых знаний об эффективности фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек при экспериментальном сахарном диабете α -токоферола ацетатом (прямой антиоксидант), эплереноном (блокатор минералокортикоидных рецепторов), карнозином (ингибитор образования конечных продуктов гликирования). Установлено, что наиболее эффективно ингибирование образования конечных продуктов гликирования карнозином. При этом α -токоферола ацетат проявляет выраженное прямое антиоксидантное действие, но не облегчает протекание нефропатии, а эплеренон оказывает нефропротекторное действие, однако оксидативный стресс при этом не ослабляется, а напротив, усиливается.

Практическая значимость работы заключается в подтверждении эффективности применения карнозина и эплеренона для фармакологической коррекции повреждения почек при сахарном диабете и в установлении нового побочного эффекта эплеренона – усиления свободнорадикального окисления в почках. В совокупности это создает основу для дальнейших исследований с целью возможного создания новых более эффективных способов комбинированной терапии диабетической нефропатии с применением средств, ослабляющих активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, и ингибиторов образования конечных продуктов гликирования.

Методология и методы исследования. Исследование выполнено с применением методов и технологий, соответствующих современным требованиям

экспериментальной фармакологии. Эксперименты на животных и лабораторные исследования выполнены в научных подразделениях ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России.

Манипуляции с лабораторными животными включали моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета, введение лекарственных препаратов и эвтаназию для изъятия почек.

Биохимические лабораторные методики включали определение в моче концентрации белка, глюкозы и креатинина, определение в гомогенате почечной ткани показателей оксидативного стресса. Кроме того, проводилась морфологическая оценка структурного и функционального состояния тканей почечного клубочка, определение количества подоцитов.

Полученные результаты подвергались статистической обработке с использованием современных методов статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Применение прямого антиоксиданта α -токоферола ацетата на фоне экспериментального сахарного диабета существенно ослабляет биохимические проявления оксидативного стресса в почечной ткани, но при этом не наблюдается облегчения протекания нефропатии.

2. Ослабление активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в почках путем применения антагониста минералокортикоидных рецепторов эплеренона способствует снижению протеинурии и восстановлению структурного и функционального состояния почечного клубочка, что происходит на фоне усиления оксидативного стресса в почках.

3. Под влиянием карнозина, применяемого в качестве средства для ингибирования образования конечных продуктов гликирования в почках при экспериментальном сахарном диабете, ослабляется оксидативное повреждение почек и существенно снижаются биохимические и морфологические проявления нефропатии. Наиболее перспективным направлением фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек при сахарном диабете является ингибирование образования конечных продуктов гликирования.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов исследования и адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Результаты диссертационного исследования были доложены на научно-практических мероприятиях различного уровня:

1. Международный медицинский форум Вузовская наука, 27-28 февраля, 2019 г, Москва;
2. Научно-практическая конференция «Наукоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения», 25 октября 2019 г., Барнаул;
3. III межрегиональная научно-практическая конференция (с международным участием) «От биопродуктов к биоэкономике», 7-8 ноября, 2019 г., Барнаул;
4. 79-международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», 21-23 апреля, 2021 г., Волгоград;
5. Всероссийская учебно-методическая конференция «Формирование навыков исследовательской работы обучающихся медицинских вузов», 21 апреля, 2021 г., Барнаул.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 4 статьи в изданиях, индексируемых международными реферативными базами данных Scopus, Web of Science; 2 тезисов в материалах конференций; 1 свидетельство о регистрации базы данных.

Структура и объем диссертации.

Объем диссертации – 124 страницы компьютерного текста. Включает введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение собственных исследований, заключение, выводы. Иллюстрирована 14 таблицами и 28 рисунками. Список использованной литературы включает 257 работ, в том числе 239 работ – иностранных авторов.

Личное участие автора. Автором лично проведены экспериментальные исследования на животных и определение биохимических показателей. Собраны первичные данные, осуществлена их статистическая обработка. Проведен анализ полученных результатов. Автор лично осуществляла подготовку научных публикаций по теме исследования и рукопись диссертации.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Диабетическая нефропатия. Эпидемиология, этиология, патогенез (Современные представления)

Диабетическая нефропатия (ДН) – одно из наиболее частых и тяжелых осложнений сахарного диабета, связанное с повышенной заболеваемостью и смертностью у больных сахарным диабетом [211]. По статистике, ДН страдает примерно 40% пациентов с сахарным диабетом 2 типа и до 30% пациентов с сахарным диабетом 1 типа [21,35]. Отмечается, что, например, в США количество пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности за период 2000-2014 годов увеличилось с более чем 40 000 до более чем 50 000 человек [42]. В Китае количество больных ДН превышает 24 миллиона человек [248]. В целом эпидемиология сахарного диабета характеризуется во всем мире отчетливой тенденцией к быстрому росту, в том числе в России [8,232]. По прогнозам специалистов, распространенность ДН также будет увеличиваться, тем более что существующие стратегии медикаментозного лечения ДН не решают всех проблем и требуют дальнейшего улучшения [80].

Патогенез ДН очень сложен и многогранен, выделяют целый ряд факторов и механизмов повреждения почечного клубочка, которые зачастую тесно взаимосвязаны, что существенно осложняет лечение [184]. Разумеется, основным этиологическим фактором, инициирующим повреждение почек при сахарном диабете, является гипергликемия и гиперглюкозурия [11].

Как известно, в норме за сутки почки отфильтровывают около 180 гр. глюкозы. Отфильтрованная глюкоза реабсорбируется в проксимальных канальцах, откуда она поступает в перитубулярные капилляры и либо возвращается в системный кровоток, либо перемещается в дистальный сегмент канальцев в качестве источника энергии [213]. Таким образом, моча здорового человека практически не содержит глюкозы [85]. В условиях же сахарного диабета картина существенно изменяется. По некоторым данным, у пациентов с сахарным диабетом 2 типа

выделение глюкозы почками увеличивается до 300% относительно нормы [140]. Это приводит к системным нарушениям ренального транспорта глюкозы, развитию выраженной гиперглюкозурии, что запускает каскад патологических процессов, приводящих к развитию нефропатии [189].

1.1.1 Подоцитопатия

Сегодня общепризнанно, что в основе развития ДН лежит подоцитопатия – состояние, при котором нарушается структура и функции подоцитов – основных клеток фильтрационного барьера, что приводит к развитию протеинурии или нефротическому синдрому [109, 239,255].

Подоциты представляют собой конечно дифференцированные эпителиальные клетки с первичными, вторичными и третичными отростками, соединенными структурой, называемой щелевой диафрагмой, которая является единственной структурой межклеточного соединения между подоцитами [179,192]. Щелевая диафрагма определяет скорость фильтрации в клубочках, позволяя свободно фильтровать воду и мелкие молекулы, но оказывая избирательное фильтрующее действие на крупные молекулы. Поверхность подоцитов разделена на две части: апикальную мембрану и базальную мембрану, которые расположены выше и ниже щелевой диафрагмы соответственно. Интегрин $\alpha 3\beta 1$ опосредует закрепление базальной мембраны подоцитов и базальной мембраны клубочков [137,201,239]. Ножной отросток подоцитов окружает клубочковые капилляры [62]. Пространство между соседними подоцитами покрыто разрывной мембраной, которая играет важную роль в клубочковой фильтрации [49,119,164]. На фоне сахарного диабета развивается гиперглюкозурия, которая провоцирует совокупность повреждающих факторов, обуславливающих исчезновение ножного отростка подоцитов и отслоение от щелевой диафрагмы или гибель подоцитов, что повреждает фильтрационный барьер клубочков и в конечном итоге приводит к возникновению протеинурии [122,125,150,165,199].

По современным представлениям, выделяют несколько основных типов гибели подоцитов при диабетической нефропатии:

- апоптоз;
- аутофагия;
- стресс эндоплазматического ретикулума;
- пироптоз;
- некроптоз;
- ферроптоз;
- митотическая катастрофа и т.д. [22].

Апоптоз является наиболее распространенным способом гибели подоцитов. В основе апоптоза лежит протеолитический каскад, индуцируемый каспазами, который в конечном итоге приводит к быстрой и необратимой гибели клеток [58]. Существует два различных пути апоптоза, а именно внешний путь и внутренний путь [208]. Внешний путь также называется путем рецептора смерти. Внутренний путь также известен как митохондриальный путь [58,67,83,103,120,243]. Митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) играет важную роль в регуляции апоптоза. МАРК – это серин/треониновая протеинкиназа, которая может активироваться под действием внеклеточных стимулов, включая цитокины, клеточный стресс, гормоны и нейромедиаторы. Сигнальный путь МАРК регулирует множество биологических процессов с помощью различных клеточных механизмов и обладает определенной специфичностью в процессе апоптоза [245]. Многими исследователями отмечается тесная связь между гиперпродукцией активных форм кислорода на фоне сахарного диабета и активацией апоптоза подоцитов [50,82,159,177].

Аутофагия («самопереваривание клеток») – консервативный катаболический процесс, приводящий к разрушению аномальных белков, органелл и макромолекул и обеспечивающий переработку продуктов распада для поддержания гомеостаза и выживания клеток [107,159,163]. Аутофагия обычно вызывается недостатком питательных веществ, гипоксией, окислительным стрессом, генотоксическим стрессом или гипергликемией [129,130,203]. Экспериментально показано, что

аутофагическая активность подоцитов снижается в условиях стрептозотоцинового сахарного диабета, что указывает на участие аутофагии в патогенезе подоцитопатии. Известно, что подоциты обладают высоким базальным уровнем аутофагии, которая необходима для поддержания гомеостаза подоцитов [39]. Хотя аутофагия является защитным механизмом для клеток, она также может привести к повреждению и гибели подоцитов в некоторых отношениях.

Стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) – явление, вызванное нарушением гомеостаза ЭПР и последующим накоплением в эукариотических клетках развернутых или неправильно свернутых белков [102]. Стресс ЭПР запускает реакцию развернутого белка (РРБ), которая состоит из трех сигнальных путей. Эти пути активируются белковыми сенсорами, такими как активирующий фактор транскрипции 6 (ATF6), фермент, требующий инозитола 1 α (IRE1 α), и PRKR-подобную ER-киназу (PERK). В покоящихся клетках эти сенсоры связывают белок 78, регулирующий уровень глюкозы (GRP78/BiP), в неактивном состоянии. Но когда неправильно свернутые белки накапливаются в ЭПР, BiP отделяется от сенсора и связывается с развернутым белком, активируя сенсор [92]. Активация РРБ поддерживает функцию ЭПР, способствует восстановлению после стресса и оказывает защитное действие от дополнительного стресса (адаптивный РРБ). Напротив, устойчивый или продолжительный стресс ЭПР может быть цитотоксичным и в конечном итоге привести к гибели клеток [55]. Подоциты в силу своей высокой способности к свертыванию белка и высокого уровня анаболической или катаболической активности очень чувствительны к стрессу ЭПР. При этом известно, что гипергликемия может вызывать стресс ЭПР подоцитов, их гибели и возникновению подоцитопатии с последующим развитием хронической почечной недостаточности [45].

Пироптоз – это тип запрограммированной клеточной гибели, вызванной активацией каспазы-1 определенными иммунореактивными клетками под воздействием патогенов и сигналов опасности [142]. Пироптоз характеризуется образованием пор лизисом клеток, высвобождением провоспалительных цитокинов и клеточного содержимого, а также активацией инфламмасом.

Инфламмосома представляет собой молекулярную платформу, которая вызывает активацию каспазы-1 и секрецию интерлейкина-1 β и IL-18 во время клеточной инфекции или стресса [73]. Активация нуклеотид-связанной инфламмосомы олигомерного домен-подобного рецептора белка 3 (NLRP3), ключевого компонента пироптоза, индуцирует активацию каспазы-1. Активированная каспаза-1 расщепляет газдермин D (GSDMD) с образованием n-концевого фрагмента GSDMD, что приводит к образованию пор в мембране и последующим воспалительным реакциям [116,251].

Некроптоз – это еще один тип запрограммированной смерти, который обладает характеристиками как апоптоза, так и некроза [203]. Типичными морфологическими признаками некроптоза являются набухание органелл и фрагментация ядерной мембраны [127]. Кроме того, нарушается целостность плазматической мембраны, происходит ее разрыв и возникает утечка клеточного содержимого, вследствие чего развивается воспалительная реакция [63]. Некроптоз вызывается интерлейкином-1 β (IL-1 β), TNF, некоторыми вирусными инфекциями и другими факторами [244]. При некроптозе активируется сигнальный каскад из взаимодействующей с рецептором протеинкиназы 1 (RIPK1), взаимодействующей с рецептором протеинкиназы 3 (RIPK3) и киназоподобных доменов смешанной линии (MLKL), что приводит к высвобождению клеточного содержимого через поврежденную плазматическую мембрану [86,242,249].

Некроптоз играет важную роль в повреждении подоцитов [197]. Исследования показали, что некроптоз подоцитов тесно связан с убиквитин-С-концевой гидролазой L1 (UCHL1), которая регулирует состояние убиквитинирования по пути RIPK1/RIPK3. Аномальная сверхэкспрессия UCHL1 в подоцитах приводит к дисубиквитинированию пути RIPK1/RIPK3, что стимулирует некроптоз и повреждение подоцитов и в конечном счете вызывает подоцитопатию [72].

Установлено, что UCHL1, как представитель группы ферментов деубиквитинирования, подвергается сверхэкспрессии в подоцитах пациентов с ДН [231]. В условиях ДН гипергликемия стимулирует некроптоз подоцитов путем активации путей RIPK1 и RIPK3, что сопровождается повышенной экспрессией

UCHL1, который дополнительно усиливает активацию пути RIPK3/MLKL и способствует некроптозу подоцитов. Следовательно, UCHL1 способствует некроптозу подоцитов, индуцированному гипергликемией, регулируя состояние убиквитинирования пути RIPK1/RIPK3. Вышеприведенные исследования демонстрируют, что путь RIPK1/RIPK3 дает новую идею для борьбы с некроптозом подоцитов при ДН. Например, делеция гена UCHL1 сокращает период полураспада белков RIPK1 и RIPK3 и таким образом снижает их экспрессию [231]. Кроме того, показано, что введение куркумина снижает выраженность некроптоза подоцитов, ассоциированного с гипергликемией, посредством инактивации продукции активных форм кислорода и аномальной экспрессии RIPK3 [53].

В контексте гипергликемии путь активации некроза опосредуется лигандами рецепторов смерти, такими как рецептор фактора некроза опухоли 1 (TNFR1) и рецептор Fas. Путь некроза, опосредованный TNFR1, является наиболее тщательно изученным. После того, как TNF- α связывается с TNFR1, различные сигнальные комплексы, а именно комплекс I, способствующий выживанию, проапоптотический комплекс IIa и некротический комплекс IIb, инициируют различные функции, а именно выживание клеток, апоптоз или некроз [79].

Ферроптоз – железо-ассоциированный тип клеточной гибели неапоптотического характера, концепция которого впервые была предложена в 2012 году с указанием на накопление активных форм кислорода липидного строения [64]. Активизация ферроптоза сопровождается снижением митохондриального объема, отсутствием концентрирования хроматина, а также повышением плотности цитоплазматической мембраны [64,241]. При этом механизм развития ферроптоза связывают с окислением липидных молекул под действием Fe^{2+} по типу Хабера-Вейса и Фентона с образованием активных форм кислорода, которое возникает в ответ на истощение клеточного глутатиона и снижении активности глутатионпероксидазы 4 типа [76,241]. Кроме того, возможна активация ферроптоза под действием противоопухолевых средств и дегенеративных процессов [64].

Также показано, что ферроптоз способствует развитию ренальных дегенеративных изменений на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета типа 1 у мышей [239]. В качестве потенциального механизма развития указанного эффекта выделяется повышение выработки активных форм кислорода под влиянием гипергликемии при сопутствующем снижении активности супероксиддисмутазы (СОД) и восстановленного глутатиона. Учитывая, что подоциты, богатые митохондриями, весьма чувствительны к действию активных форм кислорода, происходит формирование необратимых изменений структурно-функционального состояния данных клеток [216,230]. При этом показано, что повреждение подоцитов предотвращается на фоне повышения активности пероксидоредуктазы б типа, сопровождаясь подавлением ферроптоза и оксидативного стресса [230].

Принимая во внимание вышесказанное, ингибирование ферроптоза представляется в качестве перспективного механизма фармакологической коррекции ДН. Так, имеются сведения о положительном влиянии росиглитазона, ингибирующего лигазу длинноцепочечных жирных кислот-КоА 4, на течение экспериментальной ДН у мышей [230]. Кроме того, в исследовании Chen et al показано, что активный компонент экстракта *Ginkgo biloba* гинкголид В вызывает угнетение накопления липидных веществ в подоцитах в сочетании со снижением уровня триглицеридов и общего холестерина как в условиях живого организма, так и *in vitro*. При этом показано, что вышеупомянутое соединение угнетает убиквитинирование глутатионпероксидазы (ГПО) 4 типа, что вызывает подавление ферроптоза и облегчение протекания ДН [51]. Также известно, что мононатриевая соль мангиферина вызывает снижение образование липидов под действием лигазы длинноцепочечных жирных кислот-КоА 4, при этом повышая антиоксидантную активность ГПО-4 и ферроптоз-супрессора 1/CoQ10, опосредованную мевалоновой кислотой, что снижает выраженность ферроптоза на фоне стрептозотоциновой ДН у крыс [250].

Митотическая катастрофа (МК) – механизм митоз-ассоциированной клеточной гибели отсроченного типа, развивающийся в условиях различных нарушений

вступления в митоз. В результате формируются выраженные морфологические изменения клеток, включающие в себя транслокацию хромосом, аномальное строение клеточного веретена деления, наличие большого количества centrosом, а также патологические изменения строения и размеров ядра. В качестве причин развития МК выделяют стресс химического и физического генеза [86,87]. Развитие МК ассоциировано в первую очередь с молекулами киназ, специфических для клеточного цикла, таких как циклин-зависимые- и авроракиназы, а также с каспазами, сурвивином, белковыми молекулами контрольных точек клеточного цикла и др. [46].

Показано, что на фоне ДН определяются подоциты в состоянии митоза с бинуклеацией, накоплением хроматина и утратой отростка [214]. При этом зрелые подоциты не способны к пролиферации, находясь преимущественно в фазе G0 [124]. Указывается, что подоциты, несмотря на отсутствие способности к делению после воздействия повреждающего фактора, способны заново вступать в клеточный цикл [89], но образование полноценного веретена деления у зрелых подоцитов не представляется возможным ввиду отсутствия экспрессии авроракиназы В [113,114]. В связи с этим подоциты, подвергшиеся процессу дифференцировки, являются устойчивыми к митозу, в то время как пролиферация, возникающая при наличии повреждения, не приводит к восстановлению клеток, способствует, напротив, активации МК, потере клеток и прогрессированию ДН [124].

Стоит отметить, что на настоящий момент данные, свидетельствующие об использовании угнетения МК в фармакологической коррекции ДН являются весьма ограниченными и представлены исследованиями, свидетельствующими о положительном влиянии ингибирования длинной некодирующей РНК МІАТ, определяемой в большом количестве в почечной ткани и плазме крови при ДН, на выраженность МК и течение патологии [217,218,220]. Кроме того, показано, что фактор роста миелоидного происхождения вызывает ослабление протеинурии и повреждения подоцитов при активации выработки глюкагоноподобного пептида 1 типа, а также метаболизма глюкозы и липидных молекул на фоне ДН, причем

недостаток фактора роста миелоидного происхождения при данной патологии приводит к развитию МК подоцитов [91,247].

Таким образом, рассмотрены различные типы гибели подоцитов при ДН. Так, апоптоз – один из наиболее важных типов клеточной гибели – активируется под действием каспаз в присутствии АФК. Аутофагия представлена как амбивалентный процесс, играющий как защитную, так и патологическую роль, однако на настоящий момент связь данного процесса и патогенеза ДН остается малоизученной. Стресс ЭПР вызван чрезмерно длительной реакцией развернутого белка и может быть активирован в условиях гипергликемии. Кроме того, пироптоз и некроптоз также могут приводить к литической гибели подоцитов под действием сигнальных молекул. Накопление активных форм кислорода во время ферроптоза вызывает повреждение подоцитов в результате окислительного стресса. При митотической катастрофе подоциты, имеющие врожденный барьер для митоза, вступают в процесс аномального деления, который в конечном итоге приводит к потере данных клеток.

Стоит отметить, что, несмотря на выделение упомянутых выше типов гибели подоцитов, ни один из них в полной мере не объясняет точный патофизиологический механизм развития почечной дисфункции на фоне ДН.

При этом в качестве общей черты в индукции большинства процессов клеточной гибели, приводящих к развитию деградации подоцитов и прогрессированию ДН, по результатам проведенного анализа можно выделить оксидативный стресс, в связи с чем необходимо осуществить детальный анализ возможных механизмов развития указанного процесса для выявления наиболее патогенетически обоснованных способов фармакологической коррекции ДН.

1.1.2 Предполагаемые механизмы оксидативного повреждения почек и гибели подоцитов

На данный момент в качестве основных факторов, способствующих оксидативному повреждению почек на фоне сахарного диабета, выделяется прямое

прооксидантное действие, развивающееся на фоне повышения уровня глюкозы в крови, активация системы РААС, а также накопление конечных продуктов гликирования (КПГ) [34].

Стоит отметить, что само по себе повышение концентрации глюкозы в крови способствует развитию дисфункциональных изменений при ДН, связанных с накоплением активных форм кислорода [172]. Так, известно, что на фоне гипергликемии происходит подавление глутатионовой антиоксидантной системы, что проявляется как снижением количества самого антиоксидантного трипептида, так и блокадой активности ферментов антиоксидантной защиты с последующим накоплением активных форм кислорода [239]. Установлено, что в условиях *in vitro* при культивировании подоцитов на фоне гипергликемии происходит накопление пероксида водорода [170], причем искусственное добавление указанного соединения способствует образованию дисульфидных мостиков между субъединицами изоформы протеинкиназы, активируемой цГМФ, что вызывает повышение проницаемости подоцитов для альбумина [171].

Также показано, что повышенный уровень глюкозы способствует активации цитохрома P-450 и его метаболита 20-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты с последующим накоплением супероксидов, что способствовало дегенерации отростков подоцитов и их апоптозу [69]. Имеются сведения о влиянии гипергликемии на АФК-ассоциированное повышение внутриклеточной концентрации кальция в подоцитах, способствующей их гибели [126].

В настоящий момент активно изучается роль системы РААС в развитии ДН по причине влияния как на процессы почечной гемодинамики [19], так и на морфофункциональное состояние клубочков и интерстиция почечных канальцев [44,48].

Активация системы РААС начинается с проренина, причем на данный момент известно, что концентрация данного вещества на фоне сахарного диабета имеет положительную корреляцию с развитием нефро- и ретинопатии при относительно низкой продукции ренина [132]. Предположительно, проренин связывается со специфическими рецепторами с последующей активацией MAPK [167,182] и

повышением синтеза профибротических протеинов [158]. Однако направленная активация экспрессии проренина не вызвала формирования склеротических изменений в почках, что свидетельствует об активизации проренином начавшегося ранее фиброза, а не его индукцию [139,158].

Также в научной литературе показана возможная роль ренина в развитии ДН. В работе Huang Y. et al демонстрируется наличие прямой связи между ренином и повышением экспрессии трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) – цитокина, вызывающего фиброз [95], при этом на начальных стадиях диабета фиксируется сверхэкспрессия мРНК ренина [256]. Также показано, что связывание ренина со специфическими рецепторами вызывает гипертрофию мезангиума [96,157].

Кроме того, существуют сведения о влиянии ангиотензина II на течение ДН. Так, известно, что в подоцитах экспрессируются рецепторы I типа к ангиотензину II [224]. При этом указанное вещество оказывает как прямое влияние на функцию почек, так и путем системного действия [44]. Показано, что под влиянием ангиотензина II происходит высвобождение эндотелиального фактора роста с последующим расширением мезангима [196], чему также способствует ингибирование активности протеиназы в области проксимальных канальцев [233]. Кроме того, имеются данные о стимулировании ангиотензином II рецепторов почечных фибробластов, что проявляется увеличением мезангиального объема и образованием фибронектина [141]. Также происходит активация воспалительных клеток посредством выработки провоспалительных медиаторов, хемотаксиса и активации MAPK [141].

Конечным этапом активации системы РААС является увеличение секреции альдостерона. При этом отмечается, что влияние данного минералокортикоидного гормона не ограничивается увеличением реабсорбции натрия и воды в конечных отделах нефрона и как следствие, развитием гипертензивной реакции. Известно, что влияние альдостерона, имеющего известный геномный механизм действия, на почки больных диабетом выражается в развитии фибротических изменений в интерстициальном пространстве и активации воспалительных процессов

посредством выраженной активации экспрессии генов TGF- β 1 типа, а также коллагена типа IV [100]. Показано, что под влиянием альдостерона происходит стимуляция инфильтрации почечных клубочков, а также макрофагов в области канальцевого интерстиция [90]. Кроме того, обращает на себя внимание стимуляция альдостероном НАДФН-оксидазы в клетках мезангиума, что вызывает активную выработку активных форм кислорода [145]. В экспериментальном исследовании Shibata S. продемонстрировано, что альдостерон при введении лабораторным животным вызывает выраженную протеинурию, ассоциированную с развитием оксидативного стресса, гломерулярного склероза в сочетании с повышением экспрессии десмина – одного из маркеров повреждения подоцитов, при этом гистохимически продемонстрировано наличие минералокортикоидных рецепторов в подоцитах в условиях *in vitro* [194]

Наконец, одним из возможных механизмов оксидативного повреждения почек выступает накопление КПП [5] – группы биогенных химических соединений, синтез которых осуществляется по реакции аминокрупп белков, нуклеиновых кислот, а также липидных молекул с углеводами [33,111]. При этом отмечается, что умеренное образование КПП рассматривается как нормальный физиологический процесс, в то время как чрезмерное образование данных веществ может являться причиной патологических изменений организма [41,94,146].

В основу синтеза КПП положена реакция Майяра, который в начале XX века впервые привел описание химического взаимодействия между аминокислотами и глюкозой с образованием окрашенного соединения [134]. На первом этапе происходит образование основания Шиффа путем взаимодействия углевода с NH_2 -группой аминокислоты. Впоследствии осуществляется переход основания Шиффа в соединение Амадори, представляющего собой ранний продукт гликирования [149], которое необратимо деградирует до КПП. Кроме того, КПП могут образовываться путем реакции промежуточных высокореактивных соединений альдегидного и кетонного строения с белками [93,154,229]. При этом следует учитывать весьма длительный характер образования КПП, что в контексте наличия

гипергликемии указывает на взаимосвязь превентивной регуляции указанного фактора и вероятности развития васкулярных осложнений [7,169].

В результате реакции углеводов с NH_2 -содержащими веществами *in vivo* с образованием КПП приводит к выраженным изменениям биохимических свойств соединений преимущественно белкового характера [36]. Стоит отметить, что в упомянутую выше реакцию потенциально могут вступать любые свободные аминогруппы белков, из чего следует потенциальная возможность образования КПП в большинстве тканей организма [27]. На данный момент известно более 20 КПП, которые были детектированы в почечных тканях, сетчатке и хрусталике глаза, а также в свободном состоянии в плазме крови и сосудах [27,169]. Как следствие, на настоящий момент считается, что КПП являются важнейшими факторами развития атеросклеротических поражений [75], катаракты [98], болезни Альцгеймера [23,234], а также ДН [238].

Роль КПП в патогенезе ДН активно обсуждается в современной медицинской науке. Так, известно, что длительное парентеральное введение продуктов реакции глюкозы с альбумином в организм здоровых крыс способствовало развитию склеротических изменений почечных клубочков, значительному увеличению гломерулярного мезангиума, а также протеинурии [215]. Кроме того, введение аналогичных веществ в организм мышей в течение месяца вызывало формирование фиброзных изменений почечных тканей, сопровождающихся повышением образования коллагена IV типа, а также гломерулярной гипертрофией [240].

При этом отмечается, что повышение концентрации КПП может быть связано не только с длительной гипергликемией [52]. Показано, что на фоне уремии происходит накопление высоко реакционноспособных кетосоединений с последующим образованием КПП без повышения уровня глюкозы в крови [146]. Кроме того, известно, что у пациентов, страдающих терминальной почечной недостаточностью, уровень КПП существенно повышается, что связывают как с увеличением образования данных веществ по причине развития выраженного оксидативного стресса, так и путем снижения экскреции КПП на фоне развития почечной дисфункции [131,135,227]. В свою очередь, прогрессирующее

накопление КПП, функционирующее по типу «порочного круга», активизирует процессы воспаления и пролиферации фибробластов, что способствует развитию выраженного повреждения сосудов и почек [65,237].

Рассматривая механизмы повреждающего действия КПП на почечные ткани, в первую очередь стоит отметить индукцию патологических изменений морфофункционального состояния матричных структур, реализуемую посредством реакции с белками внеклеточного пространства, в частности, коллагена и ламинина, что приводит к угнетению синтеза волокон, нарушению связывания различных матричных структур между собой [47,206], а также к подавлению физиологического расщепления матричных белков, катализируемого матричными металлопротеиназами, что в конечном итоге приводит к увеличению мезангиального пространства и патологическим изменениям базальных мембран – явлений, характерных для прогрессирующей ДН [235]. Также показано, что в условиях накопления КПП происходит патологическая модификация заряда белковых молекул гломерулярных базальных мембран, сопровождающаяся выраженному увеличению почечной экскреции альбумина [195]. Кроме того, имеются сведения о наличии положительного фармакологического эффекта от введения лабораторным животным с сахарным диабетом типа 2 антител к TGF- β – веществу, экспрессия которого индуцируется КПП – сопровождавшегося подавлением потери подоцитов и развития склеротических изменений почечных клубочков [257].

Стоит отметить, что в качестве одного из таргетов для действия КПП называется специфический рецептор для указанной группы химических соединений, представляющий собой трансмембранную структуру из группы иммуноглобулинов, определяемую в нейронах, форменных элементах крови, а также в гломерулярном и тубулярном эпителии почек [111]. При этом взаимодействие КПП с рецепторами данного типа вызывает индукцию НАДФН-оксидазы с последующим накоплением активных форм кислорода, что в конечном итоге способствует геномной активации воспалительных процессов и усилению повреждения тканей на фоне сахарного диабета [83,103,243].

Как упоминалось ранее, повреждение подоцитов является одним из наиболее важных факторов развития ДН. При этом есть определенные сведения о влиянии КПП на морфофункциональное состояние данных клеток [198]. Так, показано, что у пациентов с ДН фиксируется повышение концентрации указанных веществ в области базальной мембраны клубочков с последующей активацией рецепторов к КПП [43]. При этом данные экспериментальных исследований на здоровых лабораторных животных свидетельствуют о развитии эпителиально-мезенхимального перехода подоцитов в условиях стимуляции КПП-чувствительных рецепторов, что способствует нарушению функционирования клеток данного типа [121]. В качестве механизма развития указанного явления указывается активация N-кадгерина при сопутствующем угнетении E-кадгерина [110]. Также известно, что в условиях накопления КПП происходит снижение внутриклеточного синтеза P-кадгерина, выступающего в качестве одного из структурных компонентов гломерулярной щелевой диафрагмы [110]. Кроме того, показано, что КПП-ассоциированное повышение активности TGF- β вызывает апоптоз подоцитов в условиях *in vitro* [188]. Наконец, в исследовании Bondeva T. et al показано, что под действием КПП-модифицированного альбумина происходит развитие патологических изменений белков, образующих цитоскелет, что вызывает нарушение морфофункционального состояния подоцитов [38].

1.2 Современные подходы к лечению диабетической нефропатии

Лечение диабетической нефропатии основывается на стандартной терапии, направленной на контроль уровня глюкозы и артериального давления с целью остановки прогрессирования ДН и регрессии альбуминурии [61]. Однако необходимо отметить, что в условиях ДН и почечной недостаточности, особенно при снижении скорости клубочковой фильтрации, подбор лекарственных препаратов является довольно сложной задачей, решение которой требует глубоких знаний об индивидуальных особенностях этих препаратов, особенно в части характера влияния заболеваний почек на их метаболизм [173].

Учитывая это, для контроля уровня глюкозы в крови на фоне ДН могут использоваться следующие препараты:

Производные сульфонилмочевины – группа лекарственных препаратов, блокирующих АТФ-зависимые калиевые каналы в β -клетках поджелудочной железы, стимулируя тем самым секрецию эндогенного инсулина. Среди множества препаратов данной группы наиболее предпочтительны производные сульфонилмочевины второго поколения, такие как глипизид и гликлазид, поскольку они метаболизируются печенью и выводятся с мочой в виде неактивных метаболитов [31,161].

Инкретиномиметики (ситаглиптин, линаглиптин и др.) – ингибиторы фермента дипептидилпептидаза-4 (DPP-4), повышают уровень инкретинов GLP-1 и GIP, которые стимулируют секрецию инсулина и подавляют секрецию глюкагона, что приводит к снижению уровня глюкозы в крови [166]. Препараты данной группы имеют хороший профиль безопасности и могут применяться у пациентов с нарушениями функции почек в сниженных дозах (за исключением линаглиптина, который не требует коррекции дозы) [173]. Помимо сахароснижающего эффекта, инкретиномиметики обладают ренопротекторным действием за счет антиоксидантных и противовоспалительных механизмов, а также антифибротическим действием за счет подавления TGF- β -опосредованной передачи сигналов [162,228,252]. DPP-4 экспрессируется в большинстве специфических органов и клеток с относительно высокими концентрациями и активностью в почках, особенно на щеточных границах клеток проксимальных канальцев [138,205].

Глифлозины (дапаглифлозин, эмпаглифлозин и др.) – группа лекарственных препаратов, ингибирующих в почках натрий-глюкозный котранспортер 2 типа (SLGT-2), вследствие чего компенсаторно повышается восприимчивость инсулиновых рецепторов на фоне снижения реабсорбции глюкозы в почках. Кроме того, увеличивается выведение глюкозы с мочой и снижается гипергликемия [104]. По результатам клинических исследований сердечно-сосудистых исходов эмпаглифлозина у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, данный препарат

ослабляет прогрессирование ДН и уменьшает на 39% частоту обострения нефропатии или сердечно-сосудистой смерти [221]. Также установлено, что глифлозины, помимо гипогликемического действия, обладают рядом нефропротекторных механизмов, таких как контроль артериального давления за счет снижения сосудистого сопротивления, снижения массы тела, снижения внутриклубочкового давления с целью предотвращения развития клубочковой гиперfiltrации и снижения биомаркеров повреждения проксимальных канальцев [60,101,212].

Кроме того, для контроля уровня глюкозы на фоне ДН могут использоваться бигуаниды (метформин), тиазолидиндионы (пиоглитазон, росиглитазон) и ингибиторы α -гликозидазы (акарбоза) [173]. Как известно, метформин не метаболизируется в печени и выводится почками в неизменном виде, в связи с чем данный препарат противопоказан пациентам с ДН, т.к. у них концентрация метформина в крови будет повышаться [84]. Пиоглитазон полностью метаболизируется в печени, поэтому его применение у пациентов с ДН характеризуется хорошим профилем безопасности и не требует корректировки доз. Акарбоза метаболизируется кишечными бактериями с образованием нескольких метаболитов, и всасывается лишь небольшое количество препарата. Но поскольку данные о применении у пациентов с тяжелой почечной недостаточностью все еще ограничены, следует избегать приема акарбозы у лиц с очень низкой скоростью клубочковой фильтрации [25,156].

Тем не менее, как показала практика, стандартная стратегия лечения ДН, которая заключается в строгом контроле уровня глюкозы и артериального давления, способна только замедлить скорость прогрессирования ДН, но не остановить или обратить вспять течение заболевания. Поэтому новые лекарственные препараты, воздействующие на мишени в патогенезе ДН, такие как окислительный стресс и воспаление, стали основным направлением разработки новых методов лечения [246]. В этой связи особое внимание следует уделить новым наиболее перспективным терапевтическим стратегиям лечения ДН.

Одной из таких стратегий является применение блокаторов альдостероновых рецепторов (спиронолактон, эплеренон). Как известно, повреждение подоцитов напрямую зависит от активации минералокортикоидных рецепторов [30]. Поэтому данные препараты, ингибируя рецепторы альдостерона, препятствуют развитию его геномных эффектов, что способствует ослаблению повреждения подоцитов и сохранению функций фильтрационного барьера [30]. Эффективность комбинирования ингибиторов минералокортикоидных рецепторов и стандартной сахароснижающей терапии было показано в нескольких клинических исследованиях [57,181]. К недостаткам применения описываемых препаратов при ДН и почечной недостаточности является достаточно высокий риск развития гиперкалиемии, в связи с чем во время лечения необходим тщательный контроль данного параметра.

Новым направлением в терапии ДН может стать применение антагонистов эндотелина-1. Как известно, эндотелин-1 является мощным сосудосуживающим и митогенным фактором, который обладает вазоактивными, провоспалительными и профиброгенными свойствами и имеет значение для развития сердечно-сосудистых заболеваний и ХБП. Эндотелин-1 способствует фиброзу почек посредством различных механизмов, способствует накоплению компонентов внеклеточного матрикса и пролиферации эндотелиальных клеток, стимулирует эпителиально-мезенхимальный переход и увеличивает выработку цитокинов и факторов роста [77]. Поэтому антагонисты рецепторов эндотелина (ERA) были предложены в качестве терапевтической стратегии для снижения протеинурии и замедления прогрессирования заболевания почек. Доклинические и клинические исследования показали, что применение ERA уменьшает фиброз почек, воспаление и протеинурию. В настоящее время эффективность многих ERA для лечения заболеваний почек проверяется в рандомизированных контролируемых исследованиях, однако некоторые из них, такие как авосентан и атрасентан, не были внедрены в коммерческую практику из-за побочных эффектов, связанных с их применением. Поэтому, чтобы воспользоваться защитными свойствами ERA, было предложено использовать антагонисты, специфичные для рецепторов ЭТА,

и/или комбинировать их с ингибиторами натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2i) для предотвращения отеков, основного вредного эффекта, связанного с ERA. Также изучается возможность применения двойного блокатора рецепторов ангиотензина II 1-го типа/эндотелина (спарсентана) для лечения заболеваний почек [136].

Еще одна перспективная группа препаратов для коррекции ДН – активаторы рецепторов витамина D (VDRA). В последние годы появляется все больше данных о том, что подоциты экспрессируют VDR, а сигнальный путь VD/VDR обладает мощной почечной защитной активностью против ДН [117]. Поэтому активация VDR (VDRA) защищает подоциты от повреждения и апоптоза [219]. Кроме того, известно, что 1,25-дигидроксивитамин D₃ (1,25(OH)₂D₃) – гормональная форма витамина D, который является эндокринным гормоном с различными физиологическими функциями – может снижать уровни гиперкоррекции фактора роста фибробластов 23 (FGF23), который также является фактором риска развития ДН и может повреждать подоциты [112]. Наконец, влияние активного витамина D (как парикальцитола, так и кальцитриола) на контроль протеинурии у пациентов с ХБП было изучено в клинических испытаниях. Оказалось, что эти препараты обеспечивают значительное снижение протеинурии в дополнение к блокаде ренин-ангиотензиновой системы [59].

К одним из основных и наиболее перспективных направлений коррекции ДН сегодня относят терапию, направленную против свободных радикалов. В данной области ведутся активные исследования. Однако лекарственных препаратов со специфической антиоксидантной активностью и доказанной эффективностью при ДН довольно мало. Так, весьма перспективным природным антиоксидантом является ресвератрол – полифенольное соединение, которое оказывает благотворное влияние на сердечно-сосудистые заболевания, включая заболевания почек [106,175]. Ресвератрол, как известно, является сильным поглотителем супероксидных, гидроксильных радикалов и пероксинитрита [105]. Помимо поглощения АФК, ресвератрол также обладает многими защитными свойствами от возрастных нарушений, включая заболевания почек, благодаря активации

сиртуина 1 (SIRT1). Ресвератрол может иметь значительную пользу в качестве дополнительной терапии для предотвращения повреждения почек [106].

Активаторы Nrf2 – новая группа антиоксидантных препаратов с потенциальной нефропротекторной активностью. Фактор транскрипции, Nrf2 является основным регулятором окислительно-восстановительного гомеостаза и клеточных реакций детоксикации. Активация Nrf2 приводит к комбинированной активизации нескольких антиоксидантных ферментов и цитопротекторных генов, что делает его привлекательной терапевтической мишенью для лечения осложнений диабета. Был создан экспериментальный препарат – бардоксолон метил, который является синтетическим тритерпеноидным активатором транскрипционного фактора Nrf2 и ингибитором NF-κB [180]. Проведенное исследование (52-недельное лечение бардоксолоном метилом: функция почек при ХБП/сахарном диабете 2 типа) показало, что применение бардоксолон метила было связано с улучшением расчетной СКФ у пациентов с прогрессирующей ХБП и сахарным диабетом 2 типа через 24 недели [166]. Однако в этом же исследовании была выявлена существенная токсичность бардоксолон метила, связанная с развитием сердечной недостаточности из-за задержки жидкости, что на данный момент не позволяет внедрить этот препарат в широкую практику. Однако в будущем активация Nrf2 станет важной терапевтической стратегией для предотвращения развития диабетических осложнений [202].

Суммируя вышеизложенное, на сегодняшний день разработка новых лекарственных препаратов для лечения ДН сохраняет свою высокую актуальность. Большой потенциал имеют средства, ослабляющие оксидативное повреждение почек при ДН. Основой для их создания являются знания о патогенезе оксидативного стресса при ДН. Имеются сведения о наличии нескольких механизмов развития оксидативного повреждения почек на фоне ДН, наиболее изученными среди которых являются прямое прооксидантное действие глюкозы и ее метаболитов, активация системы РААС и накопление конечных продуктов гликирования. При этом на данный момент среди сведений из доступной литературы по данной проблематике выделить наиболее значимый и

перспективный механизм с точки зрения разработки новых способов патогенетически обоснованной фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек затруднительно. Нас заинтересовала данная проблема, в связи с чем было решено провести экспериментальное исследование с целью выявления такого механизма.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Стрептозотоциновая модель сахарного диабета

Моделирование экспериментального сахарного диабета осуществлялось в соответствии с общепринятой стрептозотоциновой моделью [118].

Стрептозотоцин (Рисунок 2) – аналог нитрозомочевины, в котором фрагмент N-метил-N-нитрозомочевины связан с атомом углерода гексозы во втором положении.

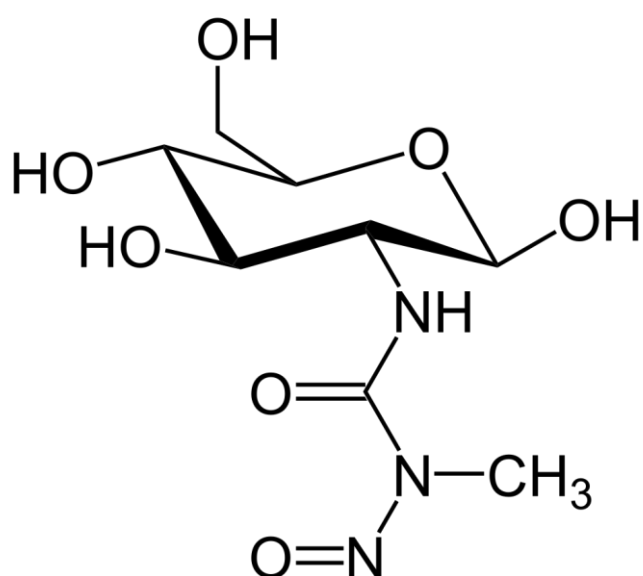


Рисунок 2 – Химическая формула стрептозотоцина

Стрептозотоцин изначально использовался в качестве антимикробного средства, а также в качестве химиотерапевтического алкилирующего агента [16,187,225]. Впервые о диабетогенном действии стрептозотоцина было сообщено в 1963 году [176]. Синдром инсулинопении, получивший название «стрептозотоциновый диабет», возникает вследствие специфического некроза β -клеток поджелудочной железы [187]. С тех пор стрептозотоцин используется в экспериментальной фармакологии для индукции сахарного диабета у животных [24].

В основе механизма токсичности стрептозотоцина лежат его алкилирующие свойства [32,115,151,209,226]. Перенос метильной группы с метилнитрозомочевинной части молекулы стрептозотоцина на молекулу ДНК вызывает ее повреждение, фрагментацию и некроз β -клеток [168,236]. В результате снижается секреция инсулина и возникает инсулин-зависимый сахарный диабет.

В нашем исследовании за основу была взята методика моделирования стрептозотоцинового сахарного диабета, созданная под руководство выдающегося отечественного фармаколога Александра Алексеевича Спасова [16]. Для моделирования сахарного диабета экспериментальным животным (см. раздел 2.2) внутрибрюшинно однократно вводился 1 мл раствора стрептозотоцина (производство Applichem, Германия) в цитратном буфере из расчета дозы 65 мг/кг. Предварительно (за 15 минут до введения стрептозотоцина) внутрибрюшинно вводился раствор цитофлавина из расчета дозировки содержащегося в нем никотинамида 115 мг/кг. Никотинамид (ингибитор поли(АДФ-рибоза)-полимеразы) предотвращает раннее угнетение функции бета-клеток в течение первых суток после воздействия стрептозотоцина, минимизирует повреждающее действие цитотоксина, что позволяет смоделировать более мягкую форму сахарного диабета [1].

2.2 Экспериментальные животные

В экспериментах были задействованы 107 крыс-самцов сток Вистар возрастом 2-4 месяца и массой 200-300 г. Крысы были выращены в виварии федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск) и имели все необходимые сертификаты.

Работа с животными осуществлялась с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и

Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России (протокол от 21.11.2017 №11).

При проведении экспериментов крысы помещались в индивидуальные метаболические клетки, оборудованные для сбора мочи. Питание осуществлялось в соответствии со стандартным лабораторным рационом, доступ к питьевой воде был неограниченным, световой режим – естественным. Необходимые манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в период с 9 до 12 часов.

2.3 Этапы исследования и их дизайн

2.3.1 Этап №1 – Моделирование экспериментального сахарного диабета

На первом этапе исследования необходимо было воспроизвести стрептозотоциновую модель экспериментального сахарного диабета и подтвердить развивающееся в данных условиях оксидативное повреждение почек, сравнив их с функцией почек интактных крыс по следующим критериям:

- развитие оксидативного стресса в почках;
- наличие глюкозурии;
- наличие протеинурии;
- изменение скорости клубочковой фильтрации;
- нарушение структурного и функционального состояния тканей почечного клубочка (повреждение подоцитов и снижение их количества и патоморфологические изменения сопутствующих тканей).

Кроме того, на первом этапе было важно оценить оптимальные сроки моделирования сахарного диабета, при которых степень развития патологии позволяет осуществить максимально объективную оценку фармакологического

воздействия исследуемых лекарственных препаратов на звенья патогенеза оксидативного повреждения почек при сахарном диабете.

Сначала было осуществлено моделирование сахарного диабета в течение 4-х недель [16]. Дизайн эксперимента представлен на рисунке 3. После введения стрептозотоцина крысы на протяжении 4-х недель находились в индивидуальных клетках, на исходном уровне и далее еженедельно осуществлялся сбор суточного объема мочи, в которой измерялась концентрация глюкозы, белка и креатинина.

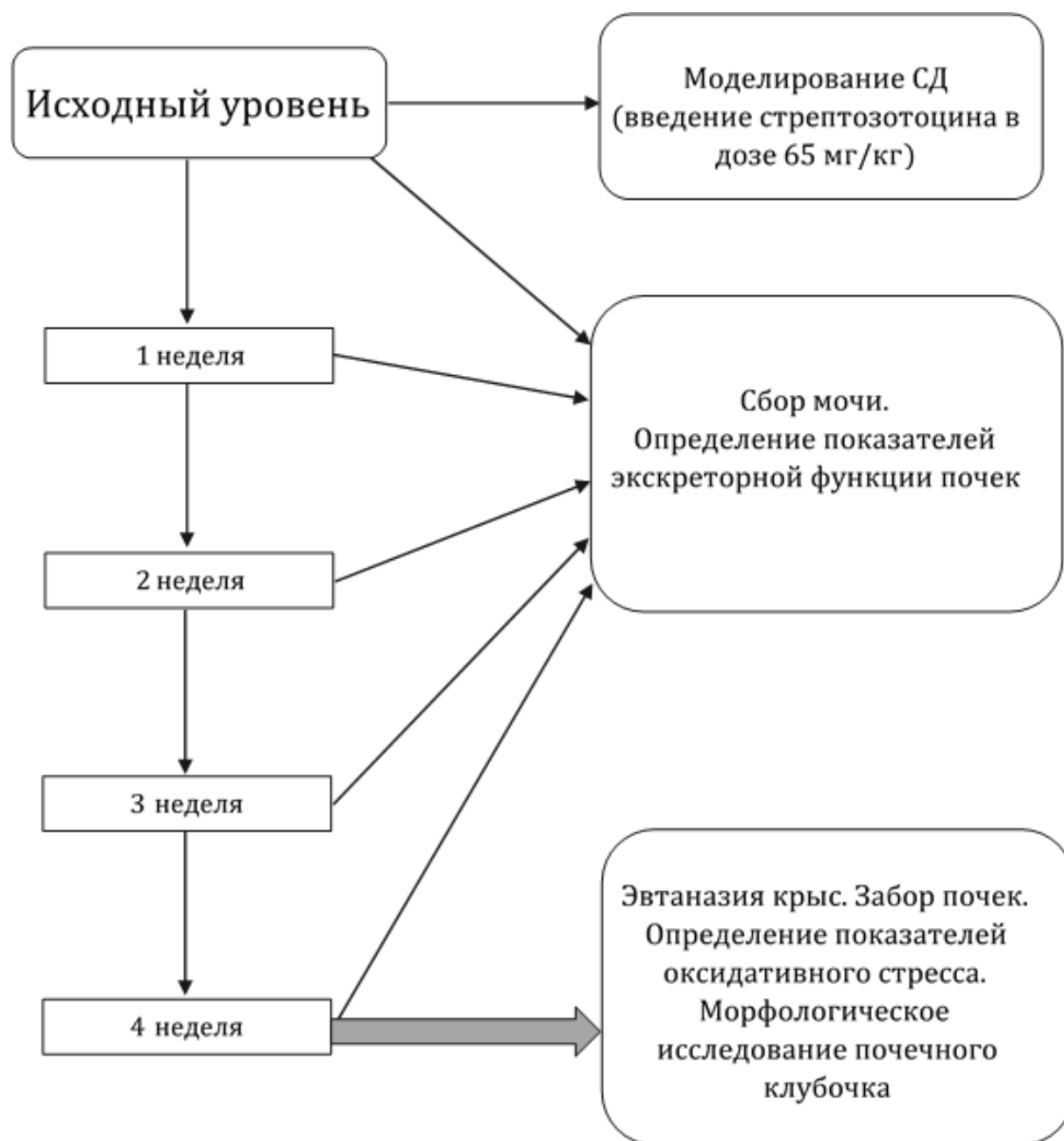


Рисунок 3 – Дизайн эксперимента при моделировании сахарного диабета в течение 4-х недель

По завершении 28 дней эксперимента крыс подвергали эвтаназии и извлекали обе почки. Левая почка использовалась для определения показателей оксидативного стресса (ТБРП, ОПА, ОАА, СОД, КАТ, ГПО), правая – для проведения морфологических исследований.

Далее было осуществлено моделирование экспериментального сахарного диабета в течение 8 месяцев с целью сравнить картину протекания патологии на ранних и поздних стадиях.

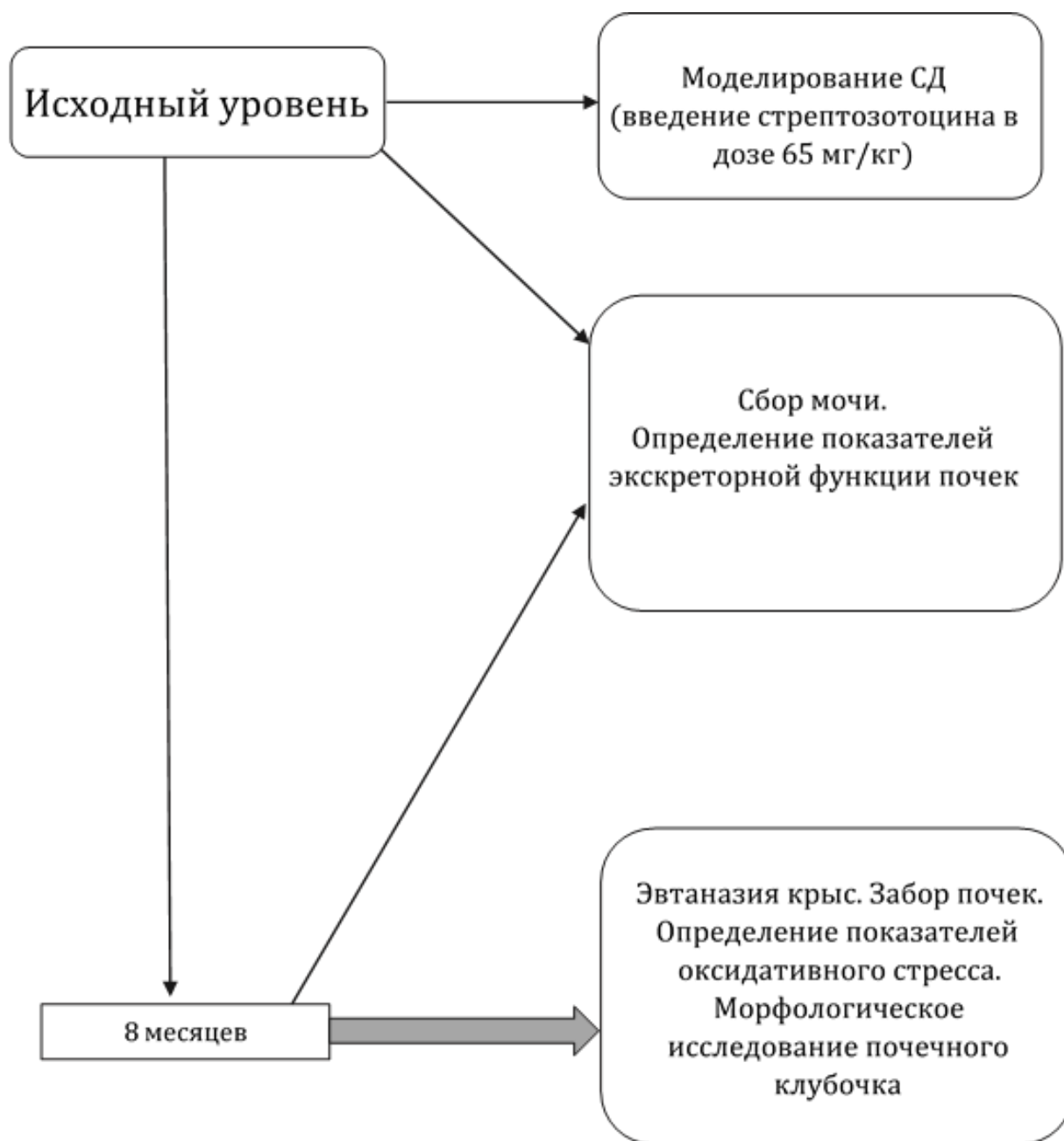


Рисунок 4 – Дизайн эксперимента при моделировании сахарного диабета в течение 8 месяцев

Согласно дизайну эксперимента (Рисунок 4), после введения стрептозотоцина крысы 7 месяцев находились в общих клетках в условиях стандартного лабораторного кормления и питья. В этот период никакие манипуляции с животными не проводились. После этого крысы вновь помещались в индивидуальные клетки, где находились еще 1 месяц, по завершению которого производился сбор суточного объема мочи, в которой измерялась концентрация глюкозы, белка и креатинина. Также, по завершению 8 месяцев эксперимента крыс подвергали эвтаназии и извлекали обе почки. Левая почка использовалась для определения показателей оксидативного стресса (ТБРП, ОПА, ОАА, СОД, КАТ, ГПО), правая – для проведения морфологических исследований.

Распределение лабораторных животных по группам на Этапе №1 представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение лабораторных животных по экспериментальным группам на Этапе №1

Экспериментальная группа	Условия эксперимента	Количество животных
Интактные (группа сравнения)	Получение эквивалентного количества физиологического раствора	12 крыс
СД 4 недели	Моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 4-х недель	13 крыс
СД 8 месяцев	Моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 8 месяцев	15 крыс
Примечание: СД–сахарный диабет.		

2.3.2 Этап №2 – Изучение патогенетически обоснованного влияния лекарственных препаратов на оксидативное повреждение и экскреторную функцию почек при экспериментальном сахарном диабете

На втором этапе предстояло решить основные задачи исследования – изучить влияние α -токоферола ацетата, эплеренона и карнозина на оксидативное повреждение и экскреторную функцию почек при экспериментальном сахарном диабете.

Дизайн экспериментов на втором этапе выглядел следующим образом (Рисунок 5).

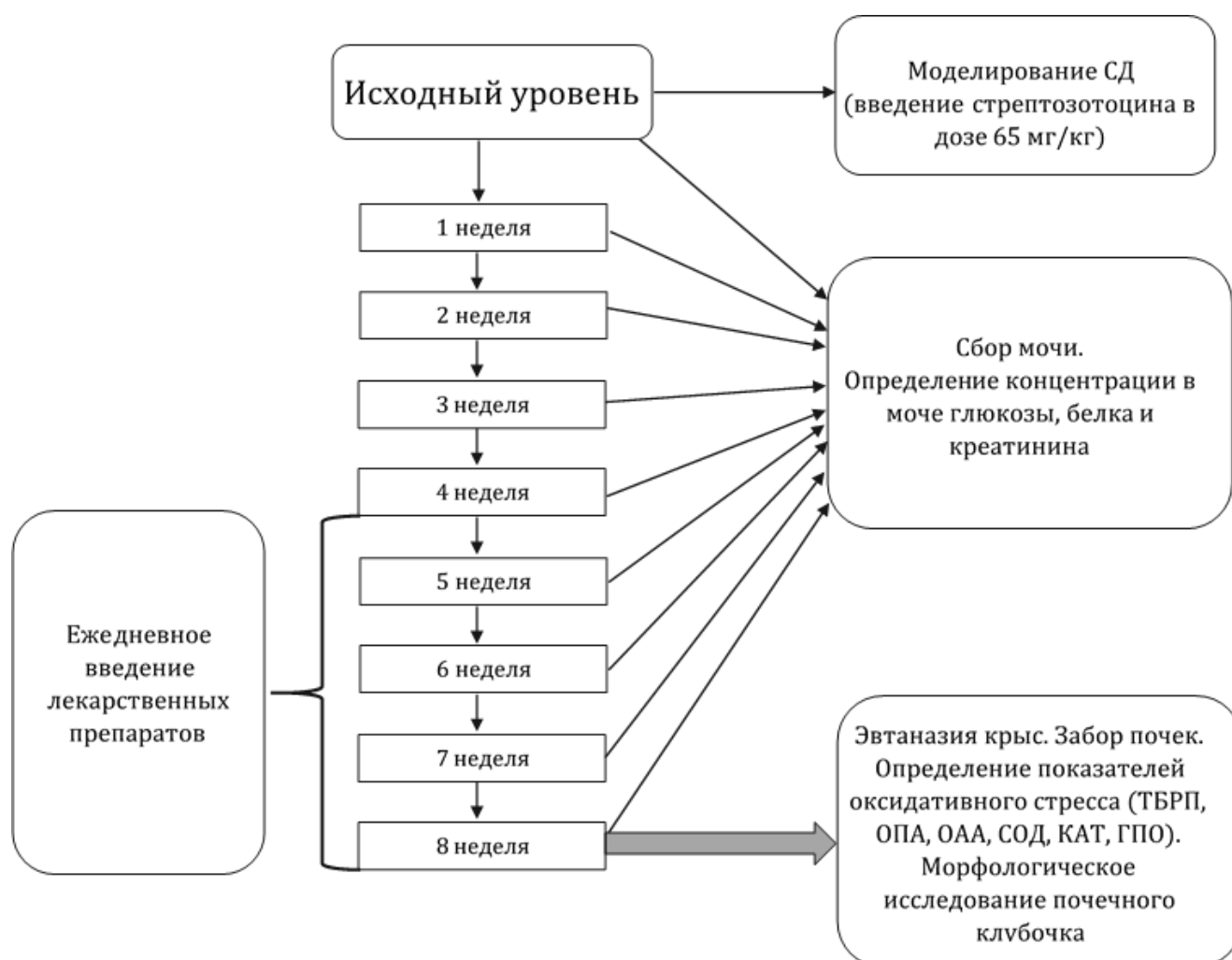


Рисунок 5 – Дизайн эксперимента при изучении влияния лекарственных препаратов на оксидативное повреждение и экскреторную функцию почек при экспериментальном сахарном диабете

В первые 4 недели после введения стрептозотоцина осуществлялось моделирование сахарного диабета без введения лекарственных препаратов, а затем еще 4 недели – на фоне ежедневного их введения. На исходном уровне и далее еженедельно осуществлялся сбор суточного объема мочи, в которой измерялась концентрация глюкозы, белка и креатинина. По завершении 8 недель эксперимента крыс подвергали эвтаназии и извлекали обе почки. Левая почка использовалась для определения показателей оксидативного стресса (ТБРП, ОПА, ОАА, СОД, КАТ, ГПО), правая – для проведения морфологических исследований.

Распределение лабораторных животных по группам на Этапе №2 представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение лабораторных животных по экспериментальным группам на Этапе №2

Экспериментальная группа	Условия эксперимента	Количество животных
Изучение влияния прямого антиоксиданта α -токоферола ацетата на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете		
Контрольная группа	Моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 8 недель	10 крыс
Группа α -токоферола ацетата	Моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 8 недель + ежедневное введение α -токоферола ацетата с 5 по 8 неделю эксперимента	12 крыс
Изучение влияния блокатора минералокортикоидных рецепторов эплеренона на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете		
Контрольная группа	Моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 8 недель	13 крыс
Группа эплеренона	Моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 8 недель + ежедневное интрагастральное введение эплеренона с 5 по 8 неделю эксперимента	13 крыс

Продолжение Таблицы 2

Изучение влияния ингибитора образования конечных продуктов гликирования карнозина на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете		
Контрольная группа	Моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 8 недель	8 крыс
Группа карнозина	Моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 8 недель + ежедневное интрагастральное введение карнозина с 5 по 8 неделю эксперимента	11 крыс

2.4 Лекарственные препараты и обоснование их использования

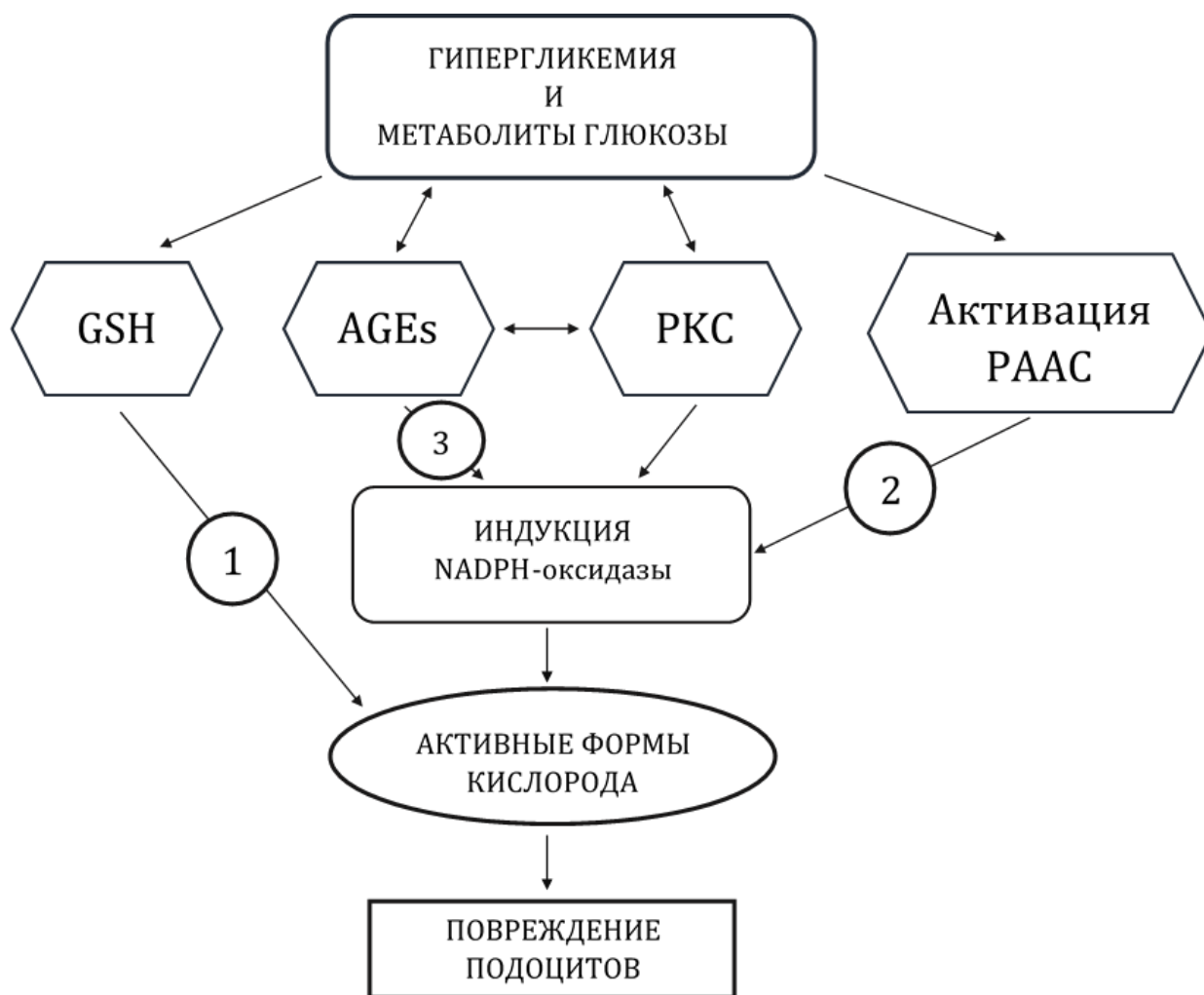
Как уже отмечалось ранее, сегодня выделяют 3 основных пути развития оксидативного повреждения почек при сахарном диабете:

- прямое прооксидантное действие глюкозы и ее метаболитов;
- активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы;
- образование конечных продуктов гликирования белков.

При этом мало изучен вопрос о том, какой из этих путей является наиболее чувствительным к фармакологической коррекции, а значит, может стать основным направлением поиска новых таргетных способов антиоксидантной нефропротекции при сахарном диабете. В нашем исследовании была поставлена задача внести вклад в решение данного вопроса, для чего были выбраны следующие фармакологические «инструменты»:

- α -токоферола ацетат;
- эплеренон
- карнозин.

Выбор данных лекарственных препаратов основывался на соответствующих мишенях в патогенезе развития оксидативного повреждения почек при сахарном диабете (Рисунок 6).



Примечание: GSH – глутатион, AGEs – конечные продукты гликирования белков, PKC – протеинкиназа C, РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система, (1) – мишень для действия α -токоферола ацетата (прямое прооксидантное действие глюкозы и ее метаболитов), (2) – мишень для действия эплеренона (активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы), (3) – мишень для действия карнозина (образование конечных продуктов гликирования белков) .

Рисунок 6 – Механизмы развития оксидативного повреждения почек при сахарном диабете и мишени для действия лекарственных препаратов

Так, α -токоферола ацетат является прямым антиоксидантом, способным ингибировать активность как алкильных, так и пероксильных радикалов [18]. Поэтому потенциальной мишенью для действия данного препарата является прямое прооксидантное действие глюкозы и продуктов ее биотрансформации, вызывающих истощение запасов нативных антиоксидантов [174]. При проведении экспериментальных исследований был использован 10% масляный раствор α -

токоферола ацетата производства ОАО "Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга", Российская Федерация. Препарат вводился внутривентрикулярно через зонд в дозе 300 мг/кг [9].

Эплеренон – известный нестероидный ингибитор минералокортикоидных (альдостероновых) рецепторов, ослабляющий активность РААС в почках. Поэтому логично было предположить, что мишенью для действия данного препарата в патогенезе развития оксидативного повреждения почек при сахарном диабете является активация РААС. Эплеренон (Польфарма, Польша) при проведении экспериментов вводили внутривентрикулярно через зонд в дозе 50 мг/кг [20].

Карнозин – биогенный дипептид, являющийся по химической структуре β-аланил-гистидином, известен с начала XX века [87]. На настоящий момент известно, что указанный дипептид обладает свойством ингибировать синтез конечных продуктов гликирования белков – известных индукторов оксидативного СД-ассоциированного повреждения почек [37]. В качестве механизмов вышеупомянутого действия карнозина выделяют связывание ионов металлов, участвующих в окислительных реакциях [152], трансгликирование основания Шиффа с выделением нативного белка [200], детоксикацию активных соединений с карбонильной группой, являющихся предшественниками конечных продуктов гликирования, в сочетании с гипогликемическими свойствами [37]. В ходе проведения экспериментов карнозин вводился внутривентрикулярно через зонд в дозе 15 мг/кг [12]. Химически чистое вещество было предоставлено ЗАО «Эвалар» (г. Бийск, Россия).

2.5 Определение показателей экскреторной функции почек

При изучении эффективности патогенетически обоснованных путей фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек при сахарном диабете в ходе экспериментов определялись следующие показатели функции почек (Таблица 3).

Таблица 3 – Определяемые биохимические показатели функции почек при моделировании экспериментального сахарного диабета

	Определяемый показатель	Диагностическое значение	Метод определения
1	Уровень диуреза (мл/сутки)	Общее функциональное состояние почек	Замер при помощи мерной лабораторной посуды
2	Концентрация глюкозы в моче (мкмоль/мл)	Индикатор развития гипергликозурии	Ферментативное окисление в присутствии глюкозооксидазы с образованием окрашенного комплекса
3	Концентрация белка в моче (мг/мл)	Индикатор развития протеинурии	Образование комплекса красного цвета с пирогалловым красным/молибдатом
4	Концентрация креатинина в моче (мкмоль/мл)	Индикатор скорости клубочковой фильтрации	Реакция Яффе (образовании креатинин-пикратного комплекса, имеющего красно-оранжевый цвет в щелочном растворе пикрата)

Все указанные показатели определялись на автоматическом биохимическом анализаторе DIRUI CS-T 240 (производитель Dirui Industriak Co, Ltd, Китай) с использованием стандартных наборов реагентов «ГЛЮКОЗА ДиаС» (производитель АО «ДИАКОН-ДС», Российская Федерация), «ОБЩИЙ БЕЛОК ДиаС» (производитель АО «ДИАКОН-ДС», Российская Федерация), «КРЕАТИНИН ДиаС» (производитель АО «ДИАКОН-ДС», Российская

Федерация) и соответствующих методик. Определение показателей осуществлялось на базе лаборатории биохимических исследований Исследовательского центра коллективного пользования ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России.

При необходимости вычислялся уровень экскреции с мочой глюкозы, белка и креатинина путем умножения суточного диуреза на концентрацию показателя в моче.

2.6 Определение показателей развития оксидативного стресса в почках

Как известно, уровень развития оксидативного стресса в биологических тканях, в том числе в почках, оценивают по совокупности показателей прооксидантного и антиоксидантного статусов [4]. К показателям прооксидантного статуса относятся концентрация тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП) и общая прооксидантная активность (ОПА). К показателям антиоксидантного статуса относятся общая антиоксидантная активность (ОАА) и показатели активности отдельных ферментов: каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО).

Указанные показатели определялись с использованием методик, которые в течение многих лет экспериментальных исследований на кафедре фармакологии Алтайского государственного медицинского университета были детально отработаны и воспроизведены много раз [4].

Для определения показателей развития оксидативного стресса в почках на фоне экспериментального сахарного диабета у крыс после эвтаназии извлекали почку и проводили пробоподготовку:

- очистка от соединительной капсулы;
- выделение коркового вещества;
- гомогенизация коркового вещества в 3 мл 0,9% раствора хлорида натрия;
- центрифугирование гомогената при 3000 об/мин в течение 15 минут;
- забор 2 мл надосадочной жидкости в необходимых разведениях.

Концентрацию ТБРП (мкмоль/мг) определяли фотометрически на спектрофотометре Cary 50 (Varian AgilentTechnologies, Австралия) при длине волны $\lambda=535$ нм. В основе метода – образование основания Шиффа, имеющего розовую окраску, в результате реакции взаимодействия малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой.

ОПА определяли также на спектрофотометре Cary 50 (Varian AgilentTechnologies, Австралия) при длине волны $\lambda=535$ нм. В основе метода лежат две последовательные реакции: прооксиданты, содержащиеся в образцах тканей, окисляют ТВИН-80 (полиоксиэтилангидросорбината моноолеат) с образованием вторичных продуктов окисления, а затем их концентрацию определяют по реакции с тиобарбитуровой кислотой, выявляя розовое окрашивание.

ОАА определяли на спектрофотометре Cary 50 (Varian AgilentTechnologies, Австралия) при длине волны $\lambda=535$ нм. В основе метода – способность ионов Fe^{2+} и аскорбиновой кислоты индуцировать процессы свободнорадикального окисления ТВИН-80. Содержащиеся в исследуемом материале ферментные и неферментные антиоксиданты подавляют Fe^{2+} /аскорбат-индуцированное окисление ТВИН-80. Интенсивность окрашивания зависит от уровня антиоксидантной активности клеток: чем она выше, тем меньше образуется продуктов окисления и тем менее яркий цвет наблюдается.

Активность СОД определяли на спектрофотометре Cary 50 (Varian AgilentTechnologies, Австралия) при длине волны $\lambda=540$ нм. В основе метода – реакция подавления синтеза нитроформазана. Чем СОД активнее, тем меньше в реакционной смеси образуется супероксид-радикал и тем менее интенсивно окрашиваются пробы.

Активность КАТ определяли на спектрофотометре Cary 50 (Varian AgilentTechnologies, Австралия) при длине волны $\lambda=410$ нм. В основе метода – способность фермента подавлять взаимодействие пероксида водорода с солями молибдена и снижать интенсивность желтой окраски. Чем выше активность каталазы, тем меньше в среде H_2O_2 и тем слабее окрашивание проб.

Активность ГПО определяли на спектрофотометре Cary 50 (Varian Agilent Technologies, Австралия) при длине волны $\lambda=412$ нм. В основе метода – реакция восстановленного глутатиона (G-SH) с реактивом Элмана, которая протекает с образованием окрашенного продукта – тионитрофенольного аниона (ТНФА). Интенсивность окрашивания в данной реакции обратно пропорциональна активности ГПО.

Определение показателей оксидативного стресса в почках осуществлялось на базе лаборатории биохимических исследований Исследовательского центра коллективного пользования ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России.

2.7 Проведение морфологических исследований почек крыс

При проведении морфологических исследований почки крыс фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Затем осуществляли проводку по спирту изопропиловому на автомате карусельного типа TISSUE-TEK VIPTM6 (Sakkura, Япония) и получали срезы толщиной 2-4 мкм на полуавтоматическом роторном микротоме Accu-Cut SRM (Sakkura, Япония). От каждой почки забирали по 3-4 препарата с обеих сторон, в которых оценивали по 20-25 почечных клубочков.

Все препараты фотографировали цифровым фотоаппаратом при различных увеличениях для полноценного представления о том, на каком уровне расположены клубочки. Работали с участками нефрона, которые располагались на одном уровне и были приближены к форме круга, исключали работу с клубочками, у которых форма была вытянута (деформирована).

Окрашивали гематоксилином и эозином в приборе для автоматической окраски микропрепаратов TISSUE-TEK Primsa (Sakkura, Япония). Также осуществляли гистохимические окраски на нейтральные и кислые гликозаминогликаны Шифф-реактивом по Мак-Манусу и 1%-ным раствором альцианового синего на 3%-ной уксусной кислоте (pH 2,5) по Сидмену соответственно. Под пленку препараты заключали в приборе для автоматического заключения микропрепаратов TISSUE-TEK Film (Sakkura, Япония).

Морфометрические исследования проводили с использованием специально созданной системы компьютерного анализа изображений, которая состоит из микроскопа Leica DME (Германия), цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения «ВидеоТест-Морфология 5.2». При помощи морфометрического метода измеряли площадь почечных клубочков и площадь просветов капилляров, а после обработки на компьютере цифровых фотографий оценили суммарную площадь сосудистого русла и площадь мезангия в почечных клубочках.

2.8 Статистическая обработка результатов исследования

Первичные данные, полученные в ходе экспериментов, обрабатывались на персональном компьютере с применением описательной непараметрической статистики, используя программный пакет Statistica 12.0 для Windows.

Результаты биохимических исследований представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – разности между 25-м и 75-м перцентилями (Me (25%;75%)). Результаты морфометрических исследований представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Статистическую значимость различия значений показателей внутри экспериментальных групп (зависимых выборок) оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона. Статистическую значимость межгрупповых различий (независимых выборок) оценивали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия показателей признавались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$ [17].

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Моделирование экспериментального сахарного диабета и изучение функции почек

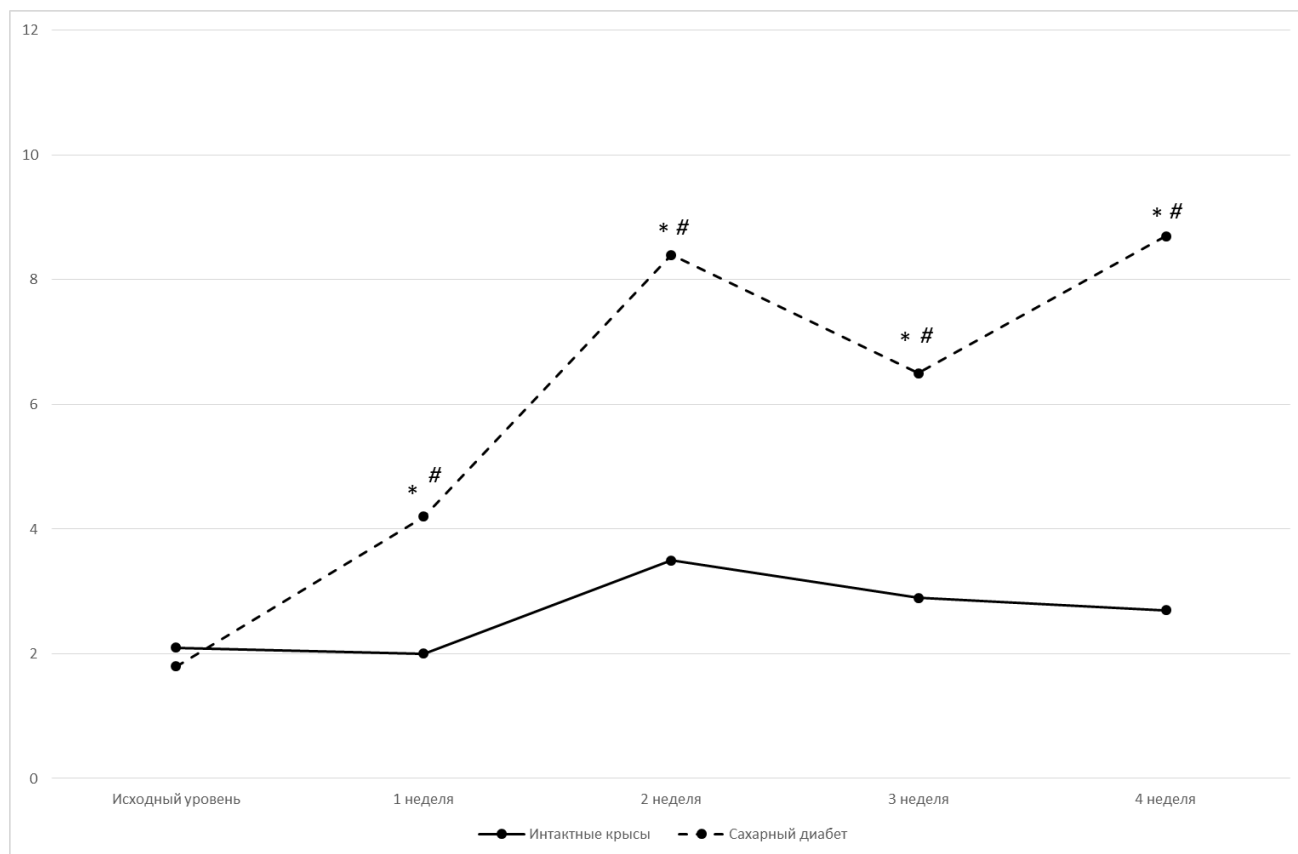
На первом этапе исследования было необходимо воспроизвести стрептозотоциновую модель экспериментального сахарного диабета и изучить показатели экскреторной функции почек и активности процесса свободно-радикального окисления в почках, а также изучить патоморфологическую картину почечных тканей для последующей оценки эффективности применяемых лекарственных препаратов. При этом важно было сравнить биохимические и морфологические признаки повреждения почек на ранних сроках моделирования сахарного диабета (4 недели) и поздних сроках (8 месяцев).

3.1.1 Биохимические и морфологические признаки повреждения почек при четырехнедельном экспериментальном сахарном диабете

Проведенные эксперименты показали, что в условиях моделирования стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 4-х недель у крыс развивалась гипергликозурия, о чем свидетельствовали результаты биохимических исследований.

Как следует из рисунка 7, на исходном уровне показатели экскреции глюкозы с мочой между группой интактных крыс и группой моделирования сахарного диабета не различались: 2,1 (1,8; 3,5) мкмоль/сутки и 1,8 (1,6; 2,0) мкмоль/сутки соответственно. В последующие 4 недели эксперимента величина описываемого показателя у интактных крыс не изменялась, находясь в диапазоне 2-3,5 мкмоль/сутки. При этом в группе моделирования сахарного диабета уровень экскреции глюкозы с мочой существенно возрастал: через 1 неделю – 4,2 (2,8; 439,5) мкмоль/сутки, через 2 недели – 8,4 (4,0; 53,3) мкмоль/сутки, через 3 недели – 6,5 (4,5; 119,4) мкмоль/сутки, через 4 недели – 8,7 (4,7; 20,9) мкмоль/сутки. Как

следствие, на всем протяжении эксперимента уровень экскреции глюкозы с мочой на фоне моделирования сахарного диабета статистически значимо превышал уровень данного показателя у интактных крыс. Полученные результаты следует расценивать как характерный признак развития экспериментального сахарного диабета.



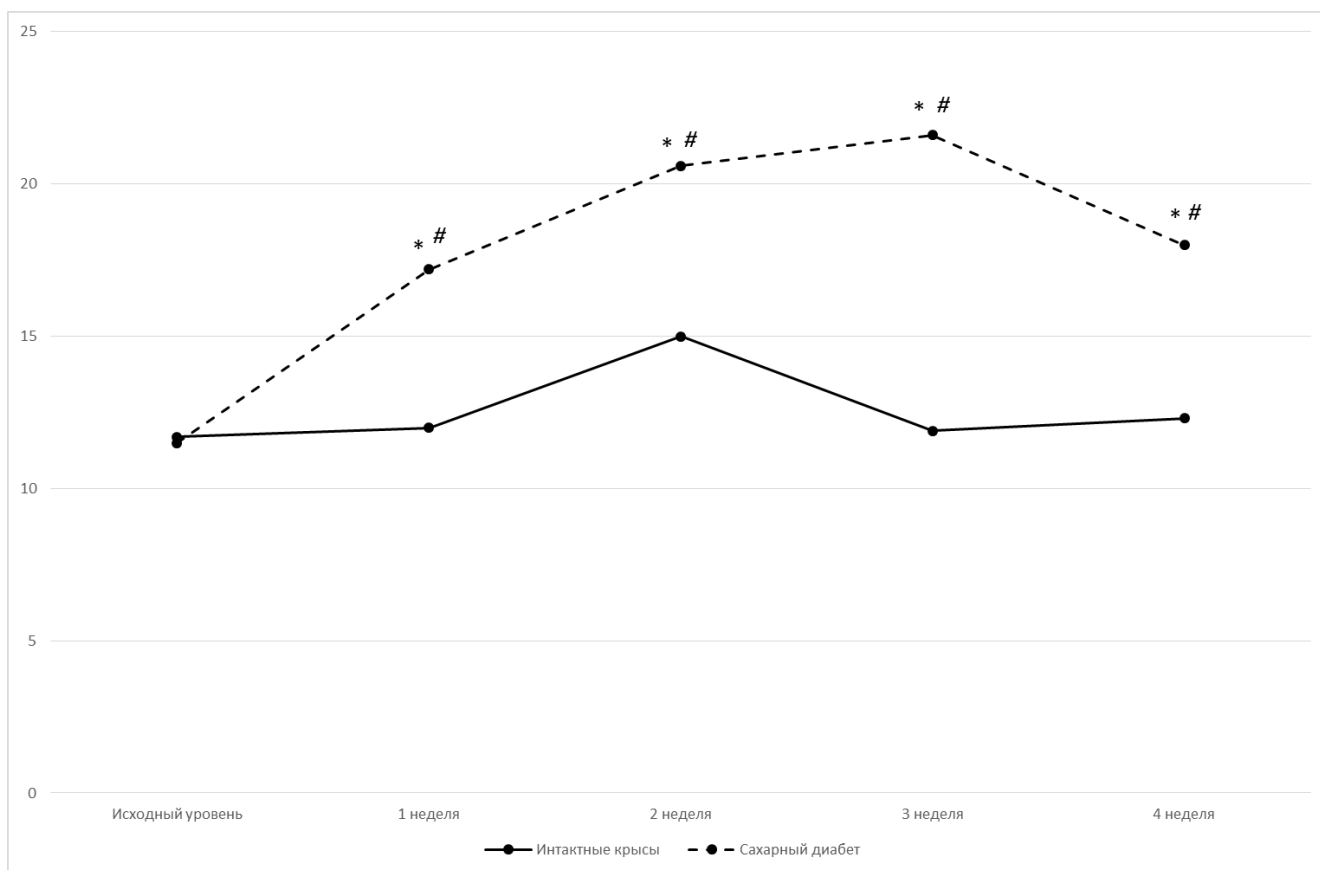
Примечание: * – статистически значимо в сравнении с исходным уровнем. # – статистически значимо в сравнении с группой интактных крыс.

Рисунок 7 – Динамика экскреции глюкозы с мочой при моделировании экспериментального сахарного диабета в сравнении с интактными крысами

На этом фоне у крыс в группе моделирования сахарного диабета развивалась протеинурия, что свидетельствовало о повреждении почечного клубочка.

Так, на исходном уровне величина экскреции белка с мочой между экспериментальными группами не различалась: 11,7 (10,8; 15,2) мг/сутки у интактных крыс, 11,5 (10,3; 13,4) мг/сутки – у крыс группы моделирования сахарного диабета (Рисунок 8). В последующие 4 недели периода наблюдений величина описываемого показателя у интактных крыс в целом оставалась

стабильной (11,9-15,0 мг/сутки), тогда как после введения стрептозотоцина она статистически значимо увеличивалась и равнялась: через 1 неделю 17,2 (13,8; 56,4) мг/сутки, через 2 недели – 20,6 (19,5; 36,0) мг/сутки, через 3 недели – 21,6 (12,8; 25,5) мг/сутки, через 4 недели – 18,0 (13,3; 31,2) мг/сутки. Все 4 недели уровень экскреции белка с мочой у крыс с экспериментальным сахарным диабетом статистически значимо превышал уровень интактных крыс.



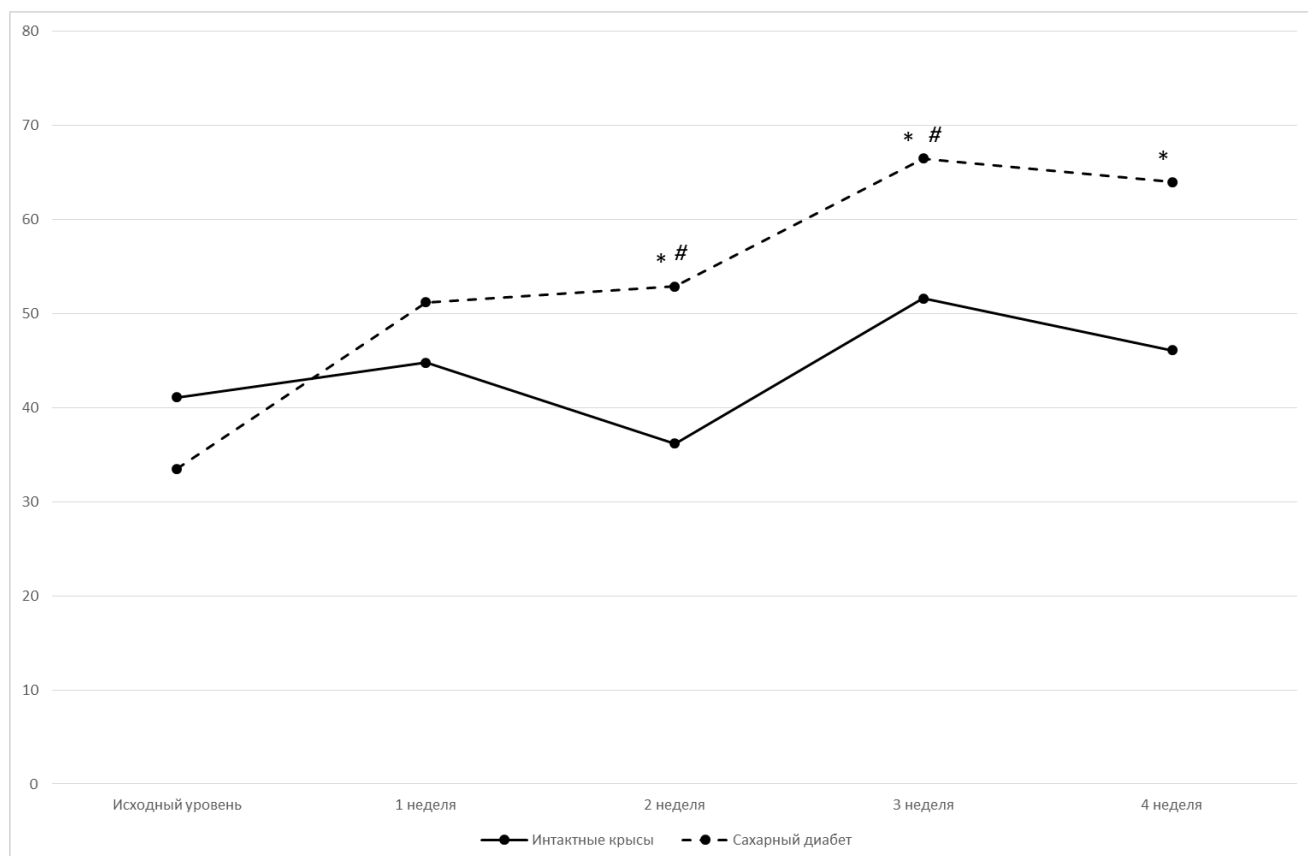
Примечание: * – статистически значимо в сравнении с исходным уровнем. # – статистически значимо в сравнении с группой интактных крыс.

Рисунок 8 – Динамика экскреции белка с мочой при моделировании экспериментального сахарного диабета в сравнении с интактными крысами

Параллельно при моделировании сахарного диабета фиксировалось увеличение экскреции креатинина с мочой (Рисунок 9).

На исходном уровне межгрупповых различий не наблюдалось: 41,1 (35,0; 54,6) мкмоль/сутки у интактных крыс, 33,5 (25,8; 40,6) мкмоль/сутки – у крыс группы моделирования сахарного диабета. В дальнейшем у интактных крыс величина

эксcreции креатинина в целом была стабильной (40,2-51,6 мкмоль/сутки), а у крыс с сахарным диабетом, начиная со 2-й недели, наблюдался статистически значимый рост величины описываемого показателя: 52,9 (43,4; 67,5) мкмоль/сутки – на 14-й день, 66,5 (54,0; 75,0) мкмоль/сутки – на 21-й день, 64,0 (45,9; 113,1) – на 28-й день.



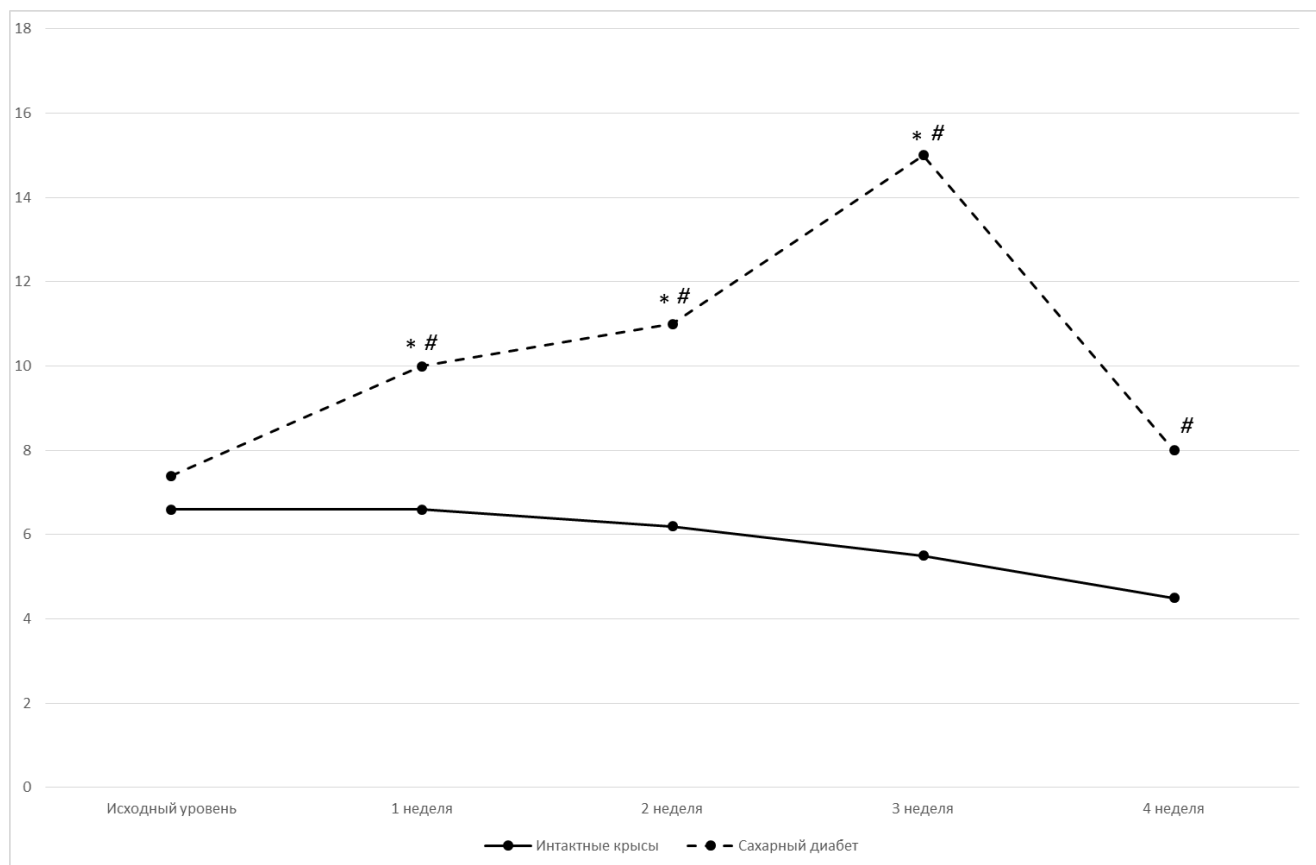
Примечание: * – статистически значимо в сравнении с исходным уровнем. # – статистически значимо в сравнении с группой интактных крыс.

Рисунок 9 – Динамика эксcreции креатинина с мочой при моделировании экспериментального сахарного диабета в сравнении с интактными крысами

Наблюдаемые изменения свидетельствуют об увеличении скорости клубочковой фильтрации, что, по-видимому, было обусловлено повреждением почечного клубочка на фоне экспериментального сахарного диабета.

Зафиксированный рост скорости клубочковой фильтрации у крыс с сахарным диабетом ожидаемо сопровождался увеличением суточного диуреза (Рисунок 10). Так, на исходном уровне величина суточного диуреза между экспериментальными

группами не различалась: 6,6 (3,4; 8,7) мл/сутки у интактных крыс, 7,4 (5,4; 8,5) мл/сутки – у крыс группы моделирования сахарного диабета.



Примечание: * – статистически значимо в сравнении с исходным уровнем. # – статистически значимо в сравнении с группой интактных крыс.

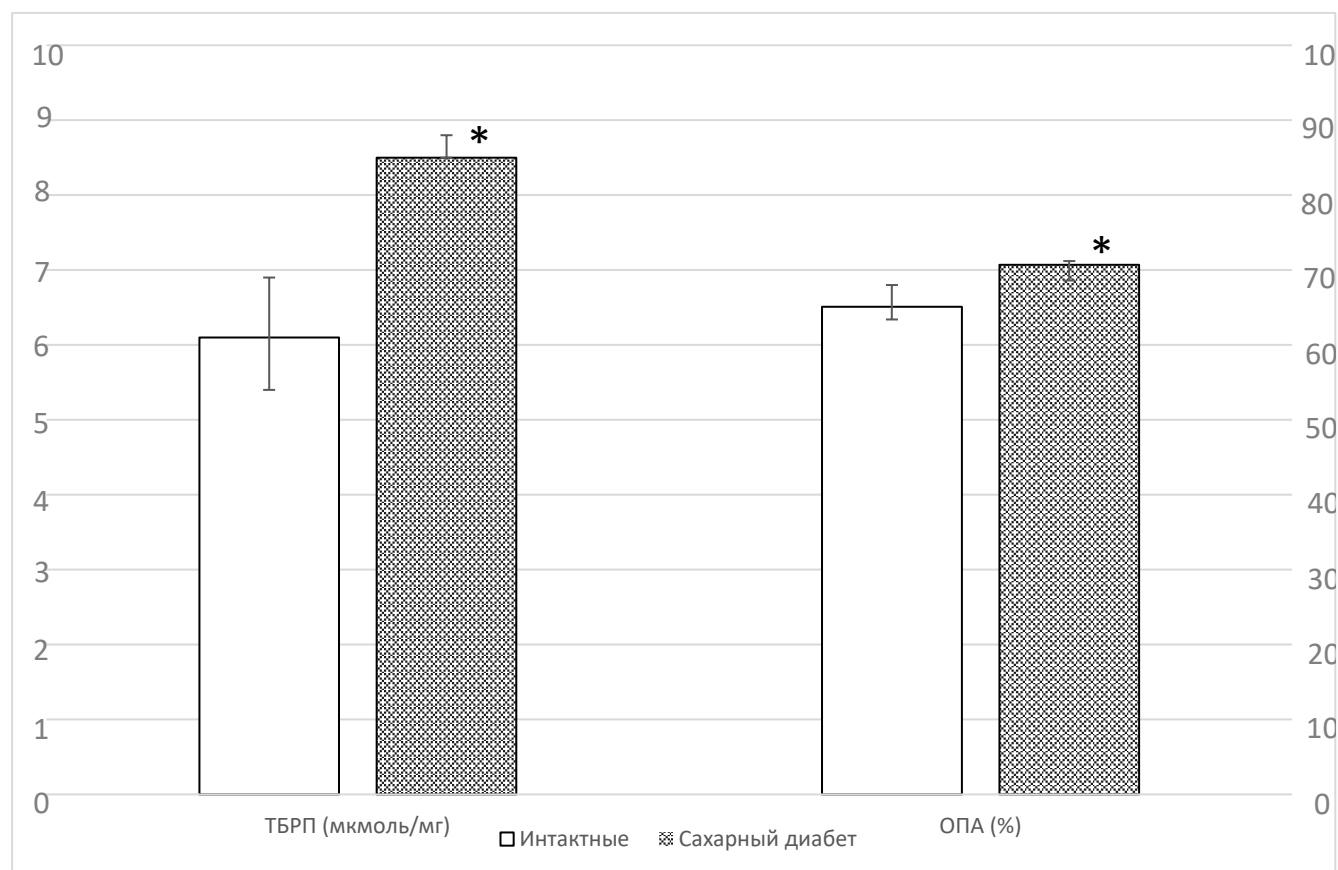
Рисунок 10 – Динамика суточного диуреза при моделировании экспериментального сахарного диабета в сравнении с интактными крысами

Затем на протяжении 4-х недель эксперимента уровень диуреза у интактных крыс в целом не изменялся (4,5-6,6 мл/сутки), а у крыс с сахарным диабетом наблюдался рост величины данного показателя: через 1 неделю – 10,0 (8,0; 12,0) мл/сутки, через 2 недели – 11,0 (7,0; 17,0) мл/сутки, через 3 недели – 15,0 (8,0; 18,0) мл/сутки, через 4 недели – 8,0 (7,0; 16,4) мл/сутки. Как следствие, на протяжении всего эксперимента уровень диуреза у крыс группы моделирования сахарного диабета был статистически значимо выше, чем у интактных крыс.

Таким образом, в наших экспериментах после введения стрептозотоцина зафиксировано развитие гипергликозурии, протеинурии, увеличение скорости клубочковой фильтрации и диуреза у крыс, что подтверждает развитие нефропатии на фоне моделирования сахарного диабета в течение 4-х недель.

Далее предстояло установить, сопровождаются ли выявленные нарушения функции почек у крыс с экспериментальным сахарным диабетом развитием оксидативного стресса в почечной ткани.

Оказалось, что после 4-х недель моделирования стрептозотоцинового сахарного диабета наблюдался статистически значимый рост концентрации ТБРП в почечной ткани в 1,4 раза по сравнению с интактными животными: 8,5 (8,5;8,8) мкмоль/мг против 6,1 (5,4;6,9) мкмоль/мг соответственно (Рисунок 11).



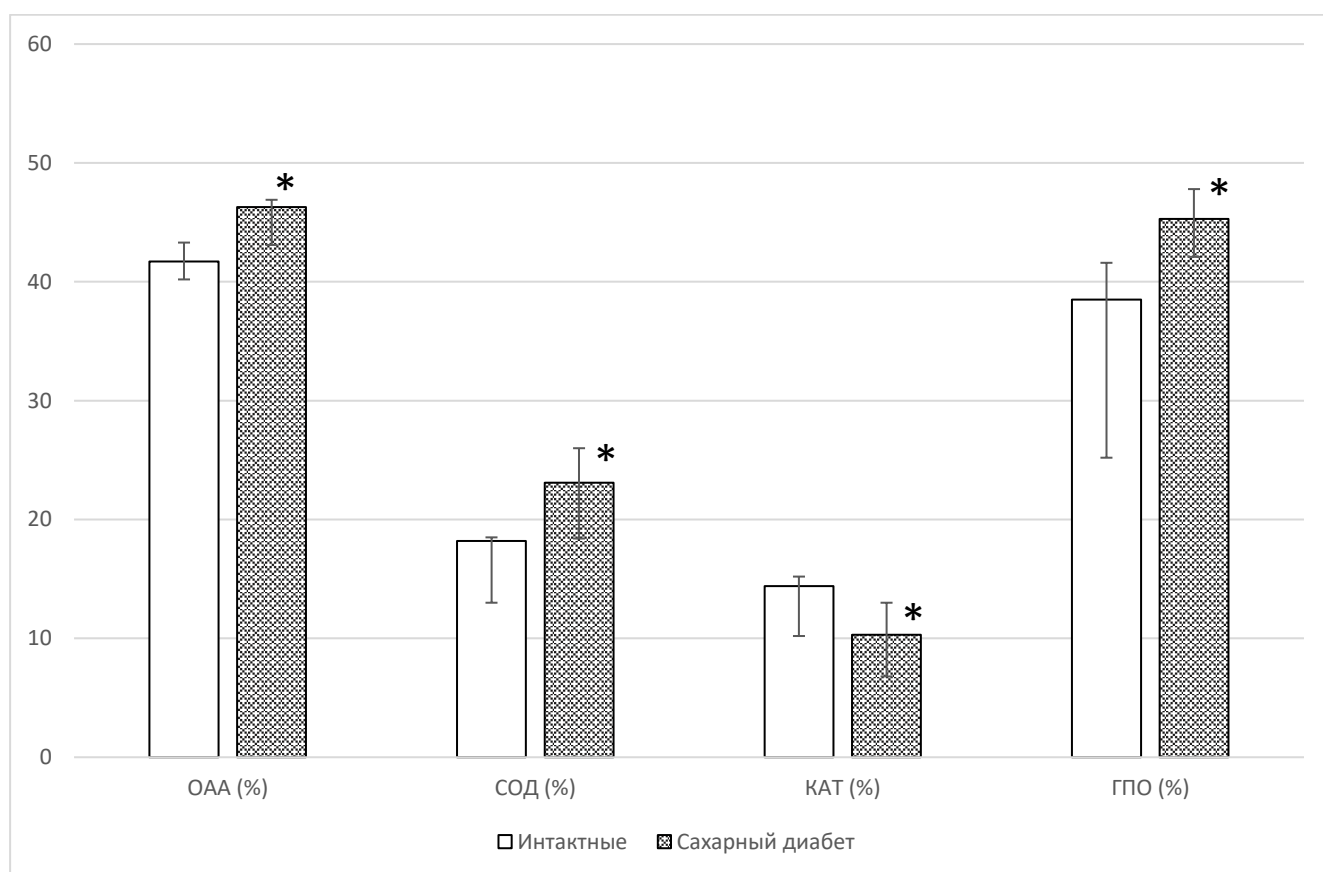
Примечание: По оси слева – значения концентрации ТБРП (мкмоль/мг). По оси справа – значения ОПА (%). Столбцы слева – интактные крысы, столбцы справа – сахарный диабет.
* – статистически значимо по сравнению с интактными крысами.

Рисунок 11 – Показатели прооксидантного статуса при моделировании экспериментального сахарного диабета в сравнении с интактными крысами

Параллельно наблюдался статистически значимый рост ОПА: 65,1 (63,4;68,0) % у интактных крыс и 70,7 (68,6;71,2) % у крыс с сахарным диабетом (Рисунок 11).

На этом фоне изучение показателей антиоксидантного статуса показало наличие следующих статистически значимых изменений в группе крыс с сахарным диабетом по сравнению с интактными животными (Рисунок 12):

- Увеличение ОАА в 1,1 раза с 41,7 (40,2;43,3) % до 46,3 (43,6;46,9) %;
- Увеличение активности СОД в 1,3 раза с 18,2 (13,0;18,5) % до 23,1 (18,4;26)%;
- Уменьшение активности КАТ в 1,4 раза с 14,4 (10,2;15,6) % до 10,3 (6,8;13,0)%;
- Увеличение активности ГПО в 1,2 раза с 38,5 (25,2;41,6) % до 45,3 (42,1;47,8)%.



Примечание: По оси слева – значения показателей.

Столбцы слева – интактные крысы, столбцы справа – сахарный диабет.

* – статистически значимо по сравнению с интактными крысами.

Рисунок 12 – Показатели антиоксидантного статуса при моделировании экспериментального сахарного диабета в сравнении с интактными крысами

Таким образом, в результате четырехнедельного моделирования стрептозотоцинового сахарного диабета в почках подопытных крыс зафиксированы характерные признаки развития оксидативного повреждения – рост значений показателей прооксидантного статуса и изменения значений антиоксидантного статуса.

Изучение морфологических признаков нефропатии при четырехнедельном экспериментальном сахарном диабете показало наличие деструктивных изменений в тканях почечного клубочка, что подтверждает развитие патологии.

В таблице 4 представлено сравнение морфометрических характеристик состояния почечного клубочка.

Таблица 4 – Показатели морфометрии почечного клубочка интактных крыс и крыс с четырехнедельным экспериментальным сахарным диабетом ($M \pm m$)

	Группы	
	Интактные крысы	Сахарный диабет
Общая площадь почечных клубочков (мкм ²)	6174,7±257,5	7918,9±367,5*
Площадь мезангия в клубочках (мкм ²)	4762,3±23,3	6823,5±225,75*
Средняя суммарная площадь сосудистого русла в клубочке (мкм ²)	2200,4±699,8	1150,9±774,6*
Средняя площадь 1 капилляра в клубочке (мкм ²)	42,8±4,3	33,8±3,7*
Среднее число подоцитов (ед.)	10,2±0,2	4,9±0,4*

Примечание: * – статистически значимо по сравнению с интактными крысами.

Как следует из таблицы, развитие экспериментального сахарного диабета сопровождалось существенными негативными изменениями морфометрических характеристик состояния почечного клубочка, главным из которых стало более чем двукратное уменьшение количества подоцитов.

При этом были выявлены следующие морфологические изменения почечного клубочка:

- Очаговое расширение межкапиллярного пространства за счет накопления ШИК-положительного материала мезангия и незначительного увеличения количества мезангиальных клеток (Рисунок 13);

- Уменьшение средней суммарной площади сосудистого русла в клубочке (Рисунки 14 и 15);

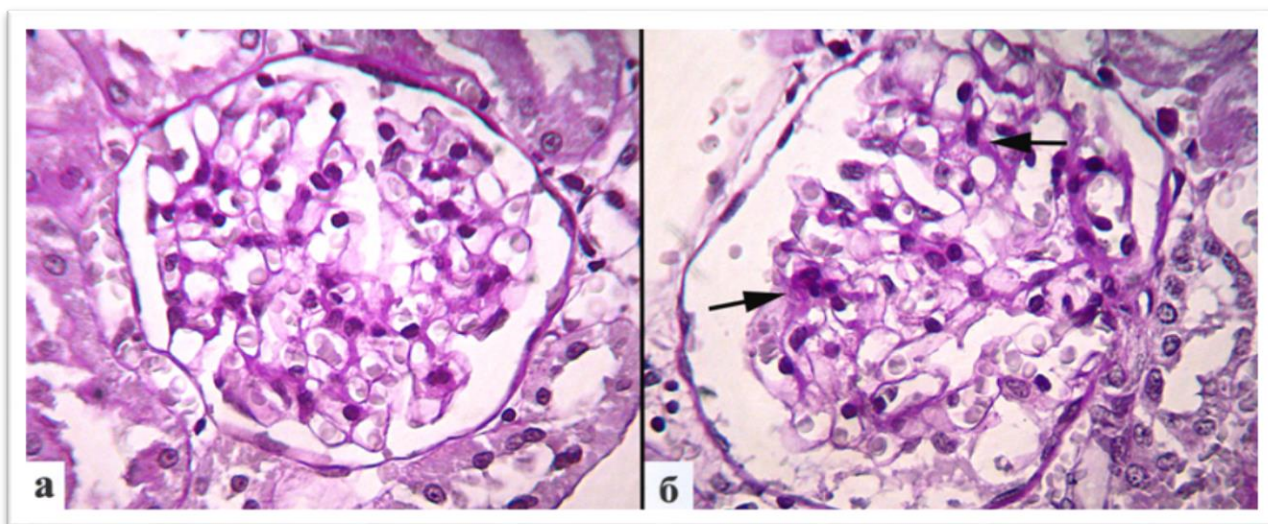
- Утолщение базальных мембран капилляров клубочков, сужение просвета капилляров. Утолщение капсулы клубочков почки;

- Увеличение размеров подоцитов, набухание подоцитов, увеличение ядер подоцитов.

Суммируя вышеизложенное, отметим, что моделирование стрептозотоцинового сахарного диабета в течение 4-х недель сопровождается развитием характерных биохимических и морфологических признаков развития оксидативного повреждения почек у крыс:

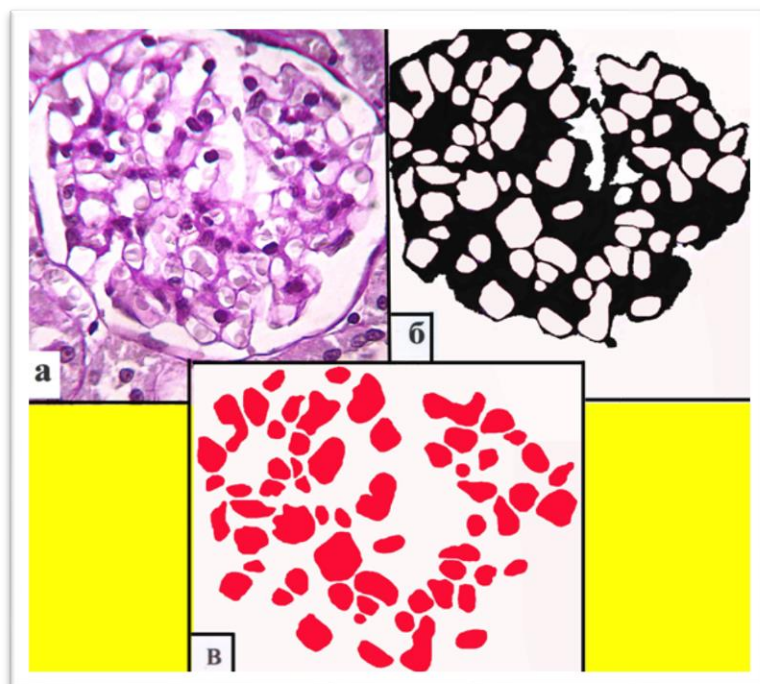
- Гиперглюкозурия;
- Протеинурия;
- Увеличение скорости клубочковой фильтрации и диуреза;
- Развитие оксидативного стресса;
- Уменьшение количества подоцитов, их набухание и увеличение в размерах, а также сопутствующие деструктивные изменения состояния тканей почечного клубочка (Рисунки 16 и 17).

В совокупности это свидетельствует о развитии нефропатии, вызванной экспериментальным сахарным диабетом.



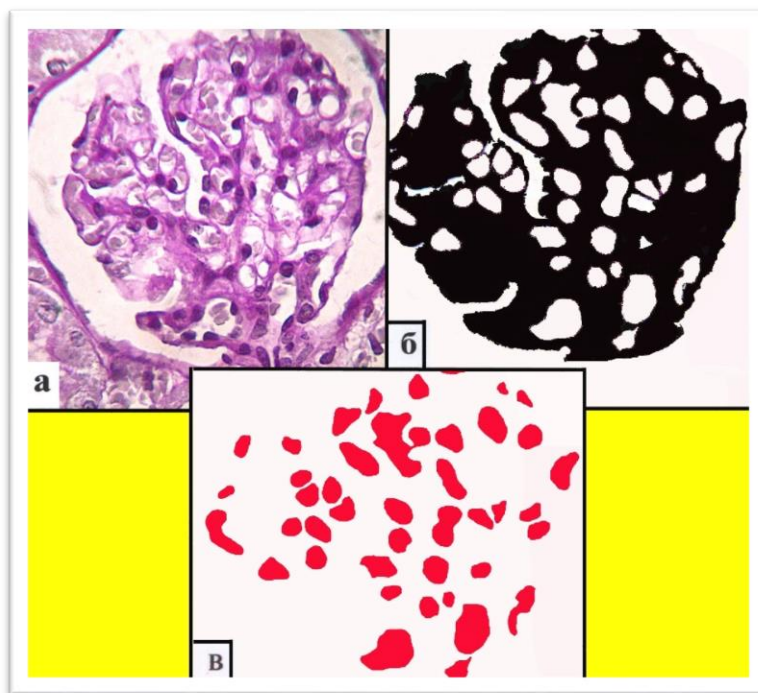
Примечание: а – интактные животные; б – животные контрольной группы: расширение межкапиллярного пространства за счет накопления ШИК-положительного материала мезангия и сужение просвета капилляров (показано стрелками). Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу. Увеличение x 1200.

Рисунок 13 – Состояние мезангиума клубочков почек крыс



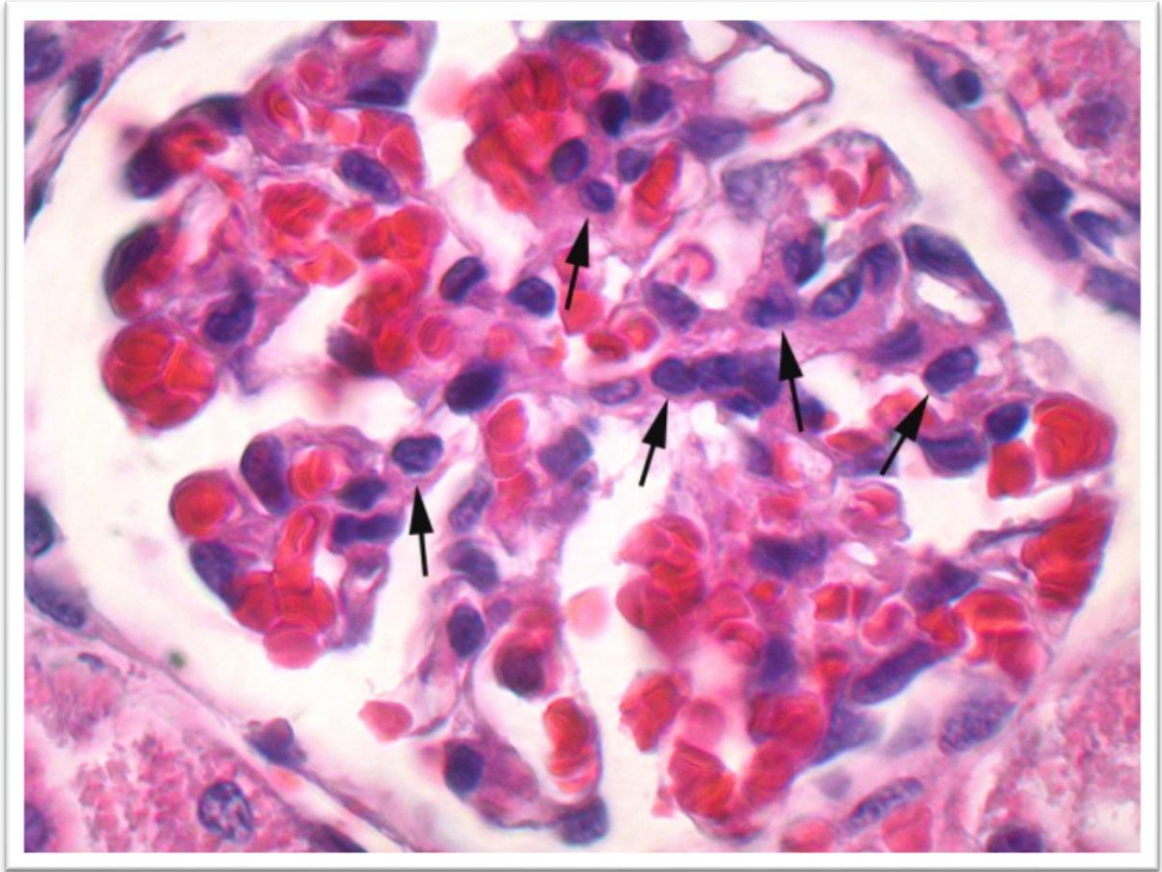
Примечание: а – клубочек почки; б – мезангиум клубочка почки интактных крыс; в – капилляры клубочка почки. Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу и компьютерная обработка. Увеличение x 1200.

Рисунок 14 – Компьютерный анализ площади мезангиума и сосудов клубочка почки интактных крыс



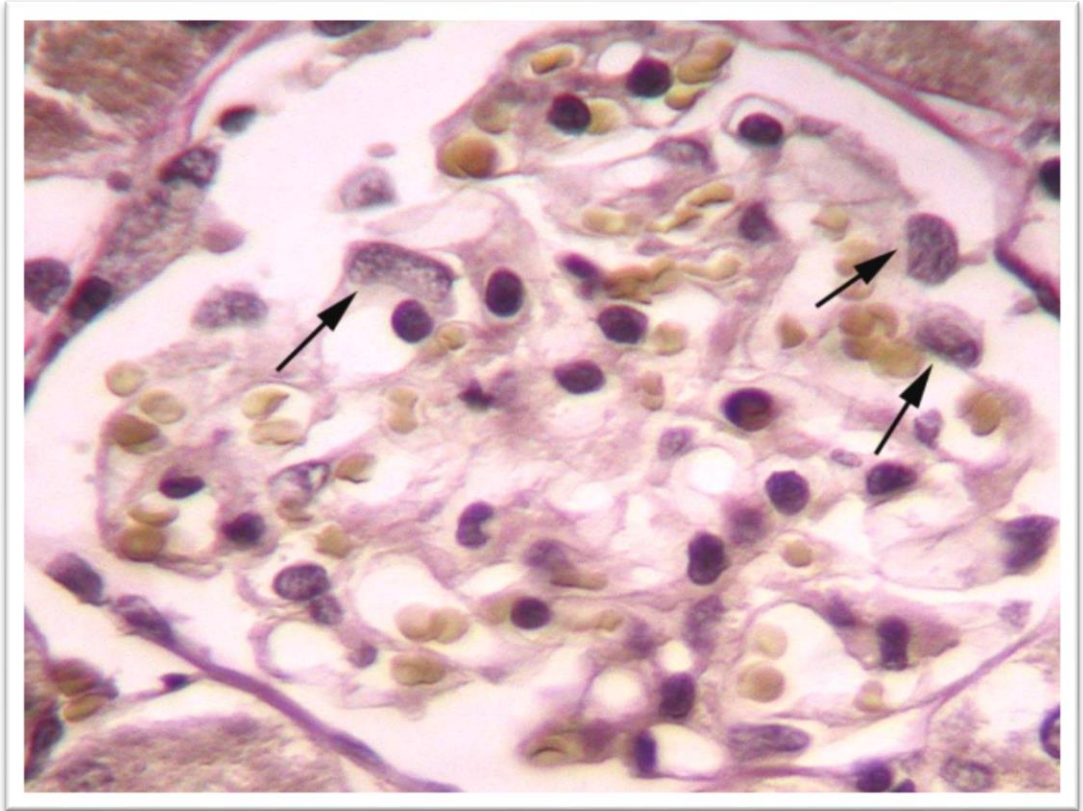
Примечание: а – клубочек почки; б – мезангиум клубочка почки интанкных крыс; в – капилляры клубочка почки. Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу и компьютерная обработка. Увеличение $\times 1200$.

Рисунок 15 – Компьютерный анализ площади мезангиума и сосудов клубочка почки при экспериментальном сахарном диабете



Примечание: в клубочках почек интактных животных подоциты небольшого размера и располагаются под эндотелием капилляров (отмечены стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 1600.

Рисунок 16 – Подоциты в клубочках почек интактных крыс

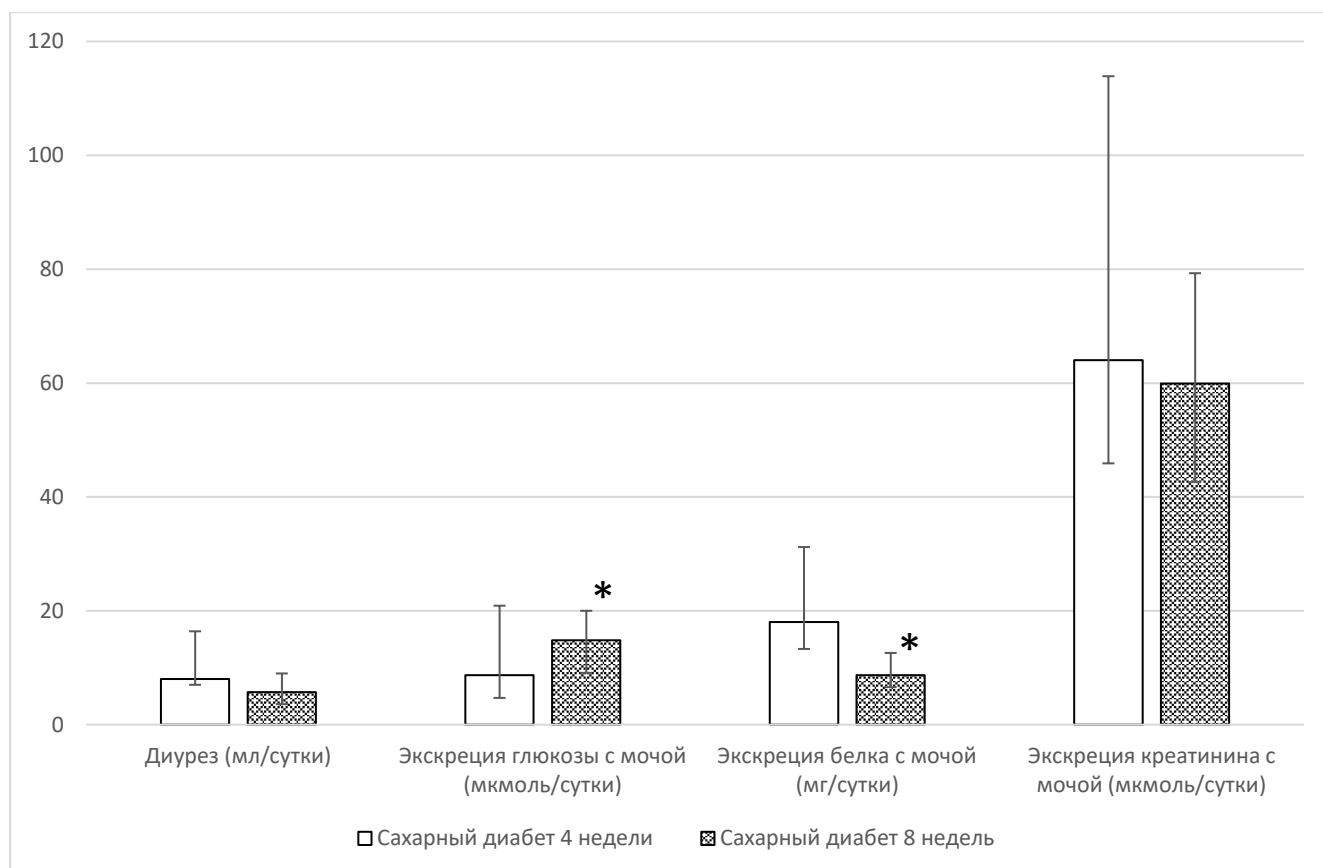


Примечание: в клубочках почек экспериментальных животных на фоне склеротических изменений число подоцитов уменьшено, они большого размера с крупными ядрами (отмечены стрелками). Окраска по Ван Гизон. Увеличение $\times 1600$.

Рисунок 17 – Подоциты в клубочках почек крыс с экспериментальным сахарным диабетом

3.1.2 Сравнение биохимических и морфологических признаков повреждения почек при четырехнедельном и восьмимесячном экспериментальном сахарном диабете

Результаты сравнения показателей экскреторной функции почек по итогам моделирования четырехнедельного и восьмимесячного сахарного диабета представлены на рисунке 18.



Примечание: По оси слева – значения показателей.

Столбцы слева – сахарный диабет 4 недели, столбцы справа – сахарный диабет 8 месяцев.

* – статистически значимо по сравнению с группой моделирования сахарного диабета в течение 4-х недель.

Рисунок 18 – Показатели экскреторной функции почек крыс при моделировании экспериментального сахарного диабета в течение 4 недель и 8 месяцев

Установлено, что в показателях диуреза и экскреции креатинина с мочой статистически значимых межгрупповых различий не наблюдалось: 8,0 (7,0; 16,4) и

5,7 (3,6;9,0) мл/сутки соответственно, 64,0 (45,9; 113,1) мкмоль/сутки и 59,9 (42,6;78,3) соответственно.

При этом уровень почечной экскреции глюкозы у крыс с 8-месячным сахарным диабетом в 1,7 раза статистически значимо превышал уровень, зафиксированный у крыс с 4-недельным сахарным диабетом: 14,8 (9,1;20,0) мкмоль/сутки против 8,7 (4,7; 20,9) мкмоль/сутки соответственно. По-видимому, это свидетельствовало о прогрессирующем течении патологии и развитии более тяжелой формы сахарного диабета.

В то же время, уровень экскреции белка с мочой на фоне восьмимесячного сахарного диабета был, напротив, статистически значимо в 2,1 раза ниже по сравнению с четырехнедельным экспериментальным сахарным диабетом: 8,7 (6,6;12,6) мг/сутки и 18,0 (13,3; 31,2) мг/сутки соответственно. Это было несколько неожиданно, однако вполне возможно явилось следствием тяжелого необратимого повреждения почек, развития фиброзно-пролиферативных изменений в области почечных клубочков при длительном воздействии повреждающего фактора.

Определение показателей прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках крыс с 8-месячным сахарным диабетом показало, что в сравнении с таковыми на фоне 4-недельного сахарного диабета наблюдались существенные изменения (Рисунок 19). Статистически значимо изменялись следующие показатели:

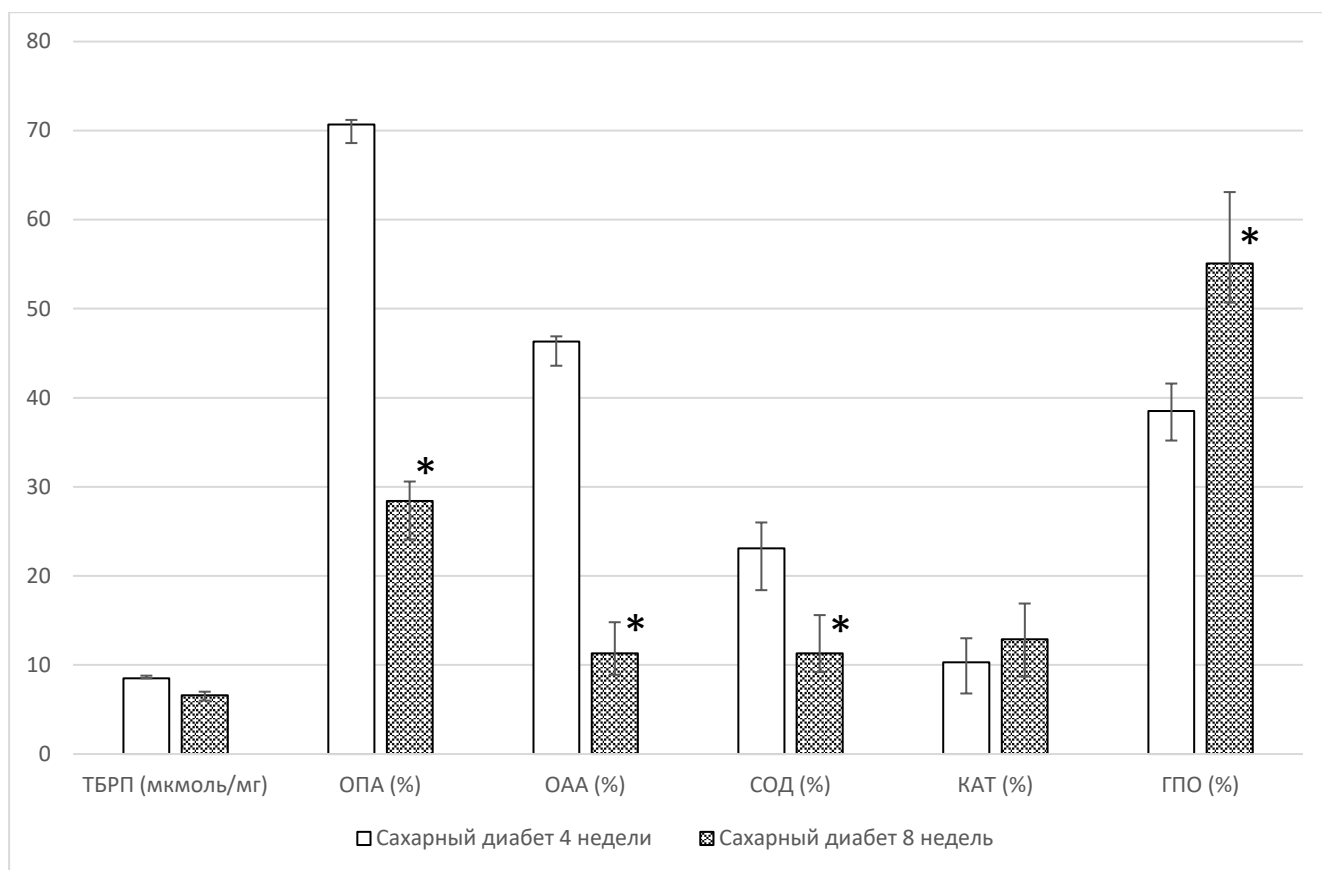
- ОПА: 28,4 (24,1;32,6) % и 70,7 (68,6;71,2) % соответственно (снижение в 2,5 раза);

- ОАА: 11,3 (8,9;14,8) % и 46,3 (43,6;46,9) % соответственно (снижение в 4,1 раза);

- активность СОД: 11,3 (9,2;15,6) % и 23,1 (18,4;26,0) % соответственно (снижение в 2 раза);

- активность ГПО: 55,1 (50,7;63,1) % и 38,5 (25,2;41,6) % соответственно (рост в 1,4 раза).

В отношении концентрации ТБРП и активности КАТ статистически значимых межгрупповых различий не наблюдалось.



Примечание: По оси слева – значения показателей.

Столбцы слева – сахарный диабет 4 недели, столбцы справа – сахарный диабет 8 месяцев.

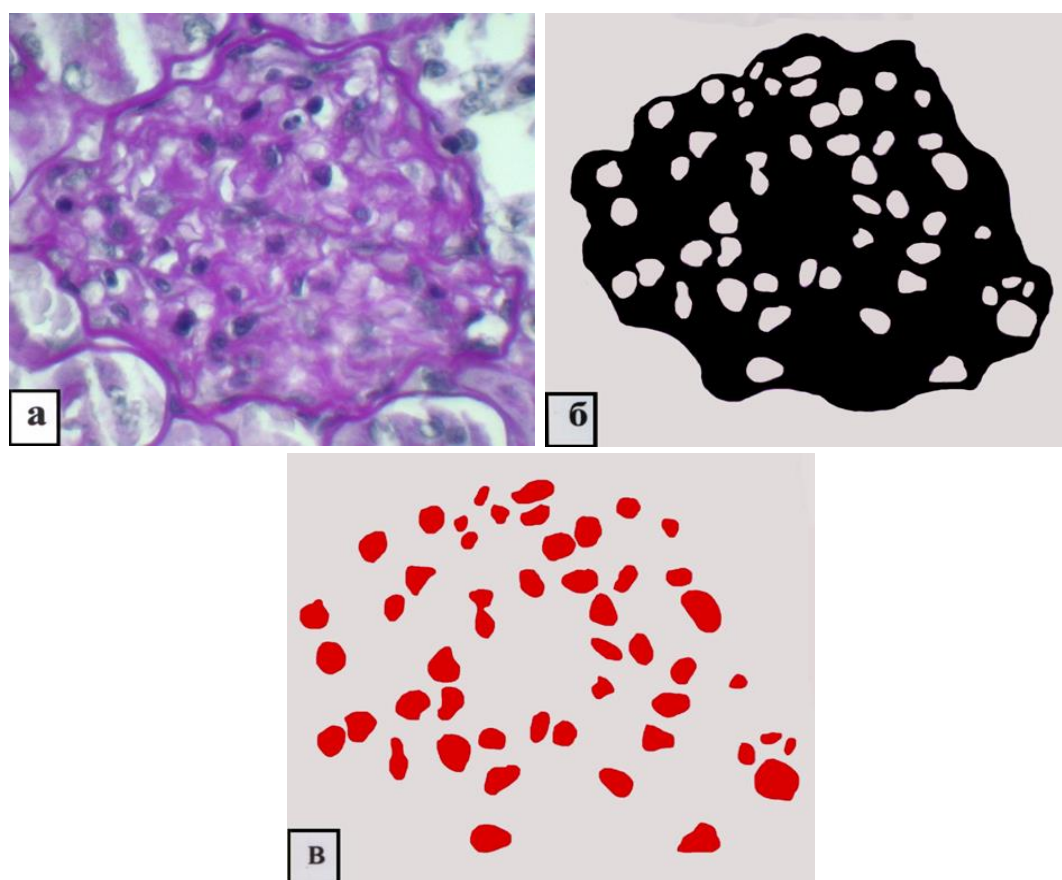
* – статистически значимо по сравнению с группой моделирования сахарного диабета в течение 4-х недель.

Рисунок 19 – Показатели прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках крыс при моделировании экспериментального сахарного диабета в течение 4-х недель и 8-и месяцев

Изучение морфологических признаков нефропатии при 8-месячном экспериментальном сахарном диабете показало значительное усугубление протекания патологии в сравнении с картиной, наблюдавшейся у крыс с 4-недельным сахарным диабетом.

Наблюдалось выраженное накопление соединительной ткани и ШИК-позитивного мезангия, что способствовало увеличению пространства между капиллярами (Рисунок 20б). Снижалась общая площадь сосудов в клубочке и площадь просвета гломерулярных капилляров (Рисунок 20в). В целом фиксировалось утолщение базальных мембран капилляров и их полнокровие,

уплощение капсулы клубочков при отсутствии полости. Интерстиций почек содержал нефросклеротические очаги, а также лимфоплазмочитарную инфильтрацию. Также отмечали гиалиново-капельную дистрофию нефроцитов, расширение просвета канальцев и утолщение их базальных мембран. Наблюдалось утолщение стенок артерий при гиперплазии эластических мембран, а также полнокровие вен. Наконец, среди массивного разрастания соединительнотканых образований дифференцировка подоцитов была практически невозможной.



Примечание: Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу и компьютерная обработка. x 1200.
20a – клубочек почки. 20б – площадь мезангиума значительно увеличена. 20в – уменьшение площади просветов капилляров клубочка почки.

Рисунок 20 – Компьютерный анализ площади мезангиума и капилляров клубочка почки на фоне моделирования восьмимесячного экспериментального сахарного диабета

Суммируя вышеизложенное, отметим, что в результате проведенных экспериментов получены биохимические и морфологические свидетельства

развития выраженного повреждения почек при моделировании восьмимесячного сахарного диабета. Так, об этом свидетельствует более выраженная почечная экскреция глюкозы относительно четырехнедельного сахарного диабета, истощение ферментных и неферментных систем антиоксидатной защиты в почечных тканях, а также существенное ухудшение гломерулярного кровотока. Главным признаком значительного усугубления протекания патологии на поздних сроках моделирования стало полное отсутствие выявленных подоцитов в почечном клубочке.

В совокупности, все вышеперечисленное свидетельствует о том, что в условиях восьмимесячного сахарного диабета происходило формирование тяжелого хронического повреждения почек, которое, по-видимому, носит необратимый характер и не поддается фармакологической коррекции. В этой связи для дальнейшего изучения влияния лекарственных препаратов на оксидативное повреждение почек при сахарном диабете была выбрана схема с моделированием патологии в течение 4-х недель с последующим введением лекарственного препарата на протяжении еще 4-х недель.

3.2 Изучение патогенетически обоснованного влияния лекарственных препаратов на оксидативное повреждение и экскреторную функцию почек при экспериментальном сахарном диабете

3.2.1 Изучение влияния прямого антиоксиданта α -токоферола ацетата на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете

Результаты изучения активности процессов свободнорадикального окисления в почках крыс группы α -токоферола ацетата показали статистически значимое снижение концентрации ТБРП относительно уровня крыс контрольной группы в 5,3 раза (Таблица 5). При этом активность антиоксидантных ферментов КАТ, СОД и ГПО между экспериментальными группами не различалась (Таблица 5).

Полученные результаты подтверждают прямое антиоксидантно действия α -токоферола ацетата без изменения ферментных механизмов антиоксидантной защиты.

Таблица 5 – Показатели активности процесса свободнорадикального окисления в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете в контрольной группе и в группе α -токоферола ацетата (Ме (25%;75%))

Группа	ТБРП (мкмоль/мг)	КАТ (%)	СОД (%)	ГПО (%)
Контрольная группа	10,1 (8,3;13,5)	9,8 (6,2;27,1)	6,8 (4,7;8,5)	34,7 (31,4;37,3)
Группа α -токоферола ацетата	1,9 (1,6;2,3)*	9,5 (7,7;24,1)	6,5 (4,8;10,3)	37,2 (34,0;40,0)

Примечание: * – статистически значимо в сравнении с контрольной группой.

На этом фоне в обеих экспериментальных группах было выявлено увеличение почечной экскреции глюкозы, белка и креатинина на протяжении всего периода эксперимента (Таблица 6). Статистически значимых межгрупповых различий зафиксировано не было.

Таблица 6 – Показатели экскреторной функции почек крыс при экспериментальном сахарном диабете в контрольной группе и на фоне введения α -токоферола ацетата (Ме (25%;75%))

Группа	Экскреция глюкозы с мочой (мкмоль/сутки)	Экскреция белка с мочой (мг/сутки)	Экскреция креатинина с мочой (мкмоль/сутки)
Исходный уровень			
Контрольная группа	0,1 (0,02;0,38)	7,3 (1,7;7,9)	18,3 (1,9;26,1)
Группа α -токоферола ацетата	0,1 (0,02;0,53)	6,0 (4,2;9,5)	18,1 (12,8;22,7)

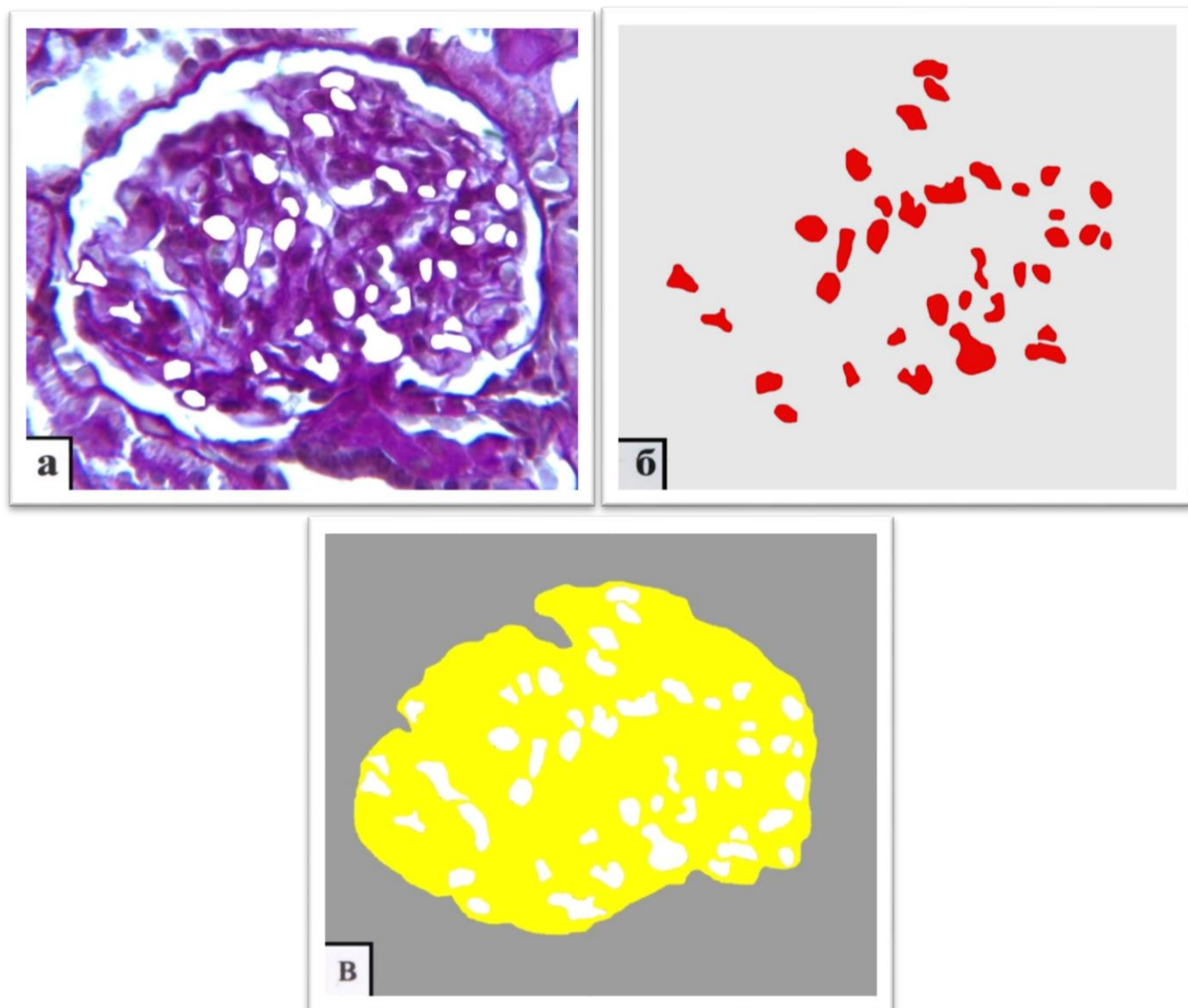
Продолжение Таблицы 6

1 неделя			
Контрольная группа	10,8 (28,6;12,2)*	10,9 (8,7;24,4)*	32,9 (28,5;41,0)*
Группа α-токоферола ацетата	10,0 (5,3;15,5)*	13,5 (9,9;15,3)*	37,1 (26,2;48,6)*
2 неделя			
Контрольная группа	0,8 (0,4;3,6)*	7,7 (6,1;14,1)	25,2 (23,6;34,8)*
Группа α-токоферола ацетата	1,7 (0,8;3,6)*	10,5 (7,6;12,4)*	35,1 (21,4;39,2)*
3 неделя			
Контрольная группа	1,3 (0,8;1,9)*	10,8 (7,3;13,5)*	46,6 (24,1;51,3)*
Группа α-токоферола ацетата	1,5 (1,2;2,2)*	9,3 (7,8;11,5)*	42,7 (31,6;44,7)*
4 неделя			
Контрольная группа	1,1 (1,0;2,3)*	10,2 (8,1;15,9)*	36,3 (29,1;52,3)*
Группа α-токоферола ацетата	0,8 (0,5;1,6)*	10,0 (8,5;11,2)*	35,2 (26,2;45,6)*
5 неделя			
Контрольная группа	0,6 (0,3;0,9)	10,9 (6,9;12,1)*	30,4 (11,5;46,8)*
Группа α-токоферола ацетата	0,6 (0,3;1,6)*	9,6 (6,1;12,2)	21,1 (10,6;32,6)
6 неделя			
Контрольная группа	2,2 (1,6;4,8)*	8,4 (4,6;9,7)	29,5 (18,4;50,5)*
Группа α-токоферола ацетата	2,2 (1,5;3,2)*	7,9 (6,3;11,9)	30,4 (18,9;39,6)*
7 неделя			
Контрольная группа	1,2 (0,8;1,3)*	7,4 (7,1;10,7)*	33,1 (24,8;49,9)*
Группа α-токоферола ацетата	1,4 (1,0;2,2)*	7,1 (5,6;9,6)	34,2 (28,1;48,0)*
8 неделя			
Контрольная группа	1,5 (0,8;2,2)*	10,3 (7,4;13,5)*	34,2 (21,0;49,7)*
Группа α-токоферола ацетата	1,7 (0,9;2,7)*	11,6 (5,9;14,5)	35,9 (19,1;45,7)*
Примечание: * – статистически значимо в сравнении с исходным уровнем.			

Проведенное морфологическое исследование показало, что клубочки почек крыс контрольной группы были увеличены в размерах, отмечалось расширение межкапиллярного пространства за счет накопления ШИК-положительного мезангия и соединительной ткани (Рисунок 21). Базальные мембраны капилляров клубочков утолщены, просвет капилляров сужен. Капсула клубочков почки выглядела утолщенной. Капилляры клубочков полнокровны. В интерстиции почки встречались очаги лимфоплазмочитарной инфильтрации. Просветы канальцев были расширены, базальные мембраны канальцев утолщены. Нефроциты находились в состоянии гиалиново-капельной дистрофии. Стенки артерий выглядели утолщенными, эластические мембраны гиперплазированными. Кровеносные сосуды находились в состоянии полнокровия.

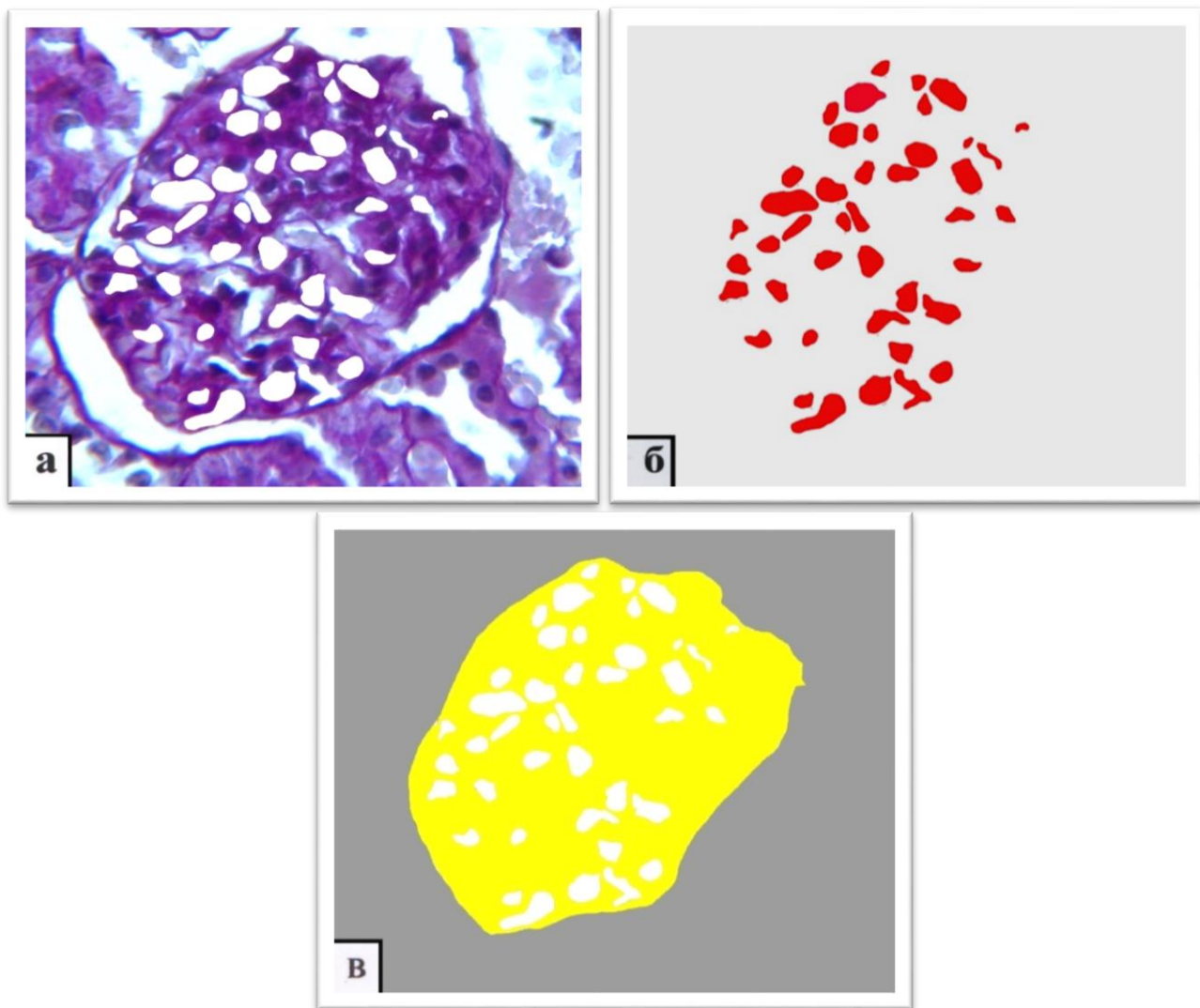
В почках крыс группы α -токоферола ацетата размер клубочков незначительно уменьшался по сравнению с контрольной группой, межкапиллярное пространство было расширено за счет накопления ШИК-положительного мезангия и соединительной ткани (Рисунок 22). Просвет капилляров был сужен, базальные мембраны капилляров клубочков утолщены. Капсула клубочков утолщены. Капилляры клубочков полнокровны. В интерстиции почки встречались единичные очаги лимфоплазмочитарной инфильтрации. Просветы канальцев были расширены, базальные мембраны канальцев утолщены. Нефроциты находились в состоянии гиалиново-капельной дистрофии. Кровеносные сосуды умеренно полнокровны. Стенки артерий и вен утолщены, эластические мембраны гиперплазированы.

Количественные показатели морфометрического исследования почек крыс экспериментальных групп приведены в таблице 7. Статистически значимых различий между группами выявлено не было.



Примечание: Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу, компьютерная обработка. x 1200. 21a – почечный клубочек. 21б – просвет гломерулярных капилляров уменьшен. 21в – площадь мезангия увеличена.

Рисунок 21 – Компьютерный анализ площади мезангиума и капилляров клубочка почки в контрольной группе



Примечание: Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу, компьютерная обработка. х 1200. 22а – почечный клубочек. 22б –. просвет гломерулярных капилляров уменьшен. 22в – площадь мезангия увеличена.

Рисунок 22 – Компьютерный анализ площади мезангиума и капилляров клубочка почки в группе α -токоферола ацетата

Таблица 7 – Показатели морфометрии почечных клубочков крыс контрольной группы и группы α -токоферола ацетата ($M \pm m$)

Группа	Площадь почечных клубочков (мкм ²)	Суммарная площадь сосудов в клубочке (мкм ²)	Площадь просвета капилляров клубочка (мкм ²)	Площадь мезангия в клубочках (мкм ²)	Подоциты (количество)
Контрольная группа	7089,5 \pm 262,7	1064,6 \pm 115,5	22,65 \pm 1,8	5396,6 \pm 85,8	28,2 \pm 2,9
Группа α -токоферола ацетата	6316,3 \pm 115,5	953,3 \pm 112,5	23,25 \pm 2,1	4548,1 \pm 115,5	34,3 \pm 2,3

Примечание: Для всех показателей – $p > 0,05$.

Обсуждая полученные результаты, отметим, что они в определенной степени оказались неожиданными. С одной стороны, α -токоферола ацетат оказал свое прямое антиоксидантное действие в почках, о чем говорит пятикратное снижение относительно контроля заболевания концентрации ТБРП – главного маркера перекисного окисления мембранных фосфолипидов. При этом на активность антиоксидантных ферментов препарат действия не оказал, что также хорошо согласуется с прямым неферментным характером антиоксидантного эффекта α -токоферола ацетата.

Однако при этом сколь-нибудь существенных изменений в картине протекания экспериментальной патологии оказанный антиоксидантный эффект препарата не вызвал. Высокий уровень протеинурии и скорости клубочковой фильтрации сохранялся, а морфологические изменения тканей и клеток почечных клубочков были идентичны контрольной группе.

Полученные результаты позволяют предположить, что подавление прямого компонента оксидативного эффекта глюкозы и продуктов ее метаболизма недостаточно для нормализации структуры и функции почечного фильтрационного барьера. Возможно, опосредованные механизмы оксидации вносят гораздо более существенный вклад в развитие нефропатии, в связи с чем поиск эффективных методов фармакологической коррекции оксидативного

повреждения почек при сахарном диабете требует изучение потенциального лечебного эффекта препаратов-таргетов для этих опосредованных механизмов.

Также необходимо отметить, что влияние α -токоферола ацетата на течение диабетической нефропатии изучалось разными исследователями. И существует целый ряд работ, в которых показана эффективность данного препарата, как антиоксиданта, в лечении хронической болезни почек [78]. В то же время, другие авторы считают, что роль витамина Е в коррекции ДН противоречива и ее еще предстоит изучать. Как бы то ни было, в проведенных нами экспериментах α -токоферола ацетат не являлся объектом исследования, а лишь «инструментом» для оценки перспективности прямой антиоксидантной коррекции в лечении ДН. И в данной работе впервые показано, что даже выраженное подавление свободнорадикального окисления в почках на фоне экспериментального сахарного диабета прямым антиоксидантом не позволяет облегчить протекание диабетической нефропатии.

3.2.2 Изучение влияния блокатора минералокортикоидных рецепторов эплеренона на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете

Проведенные эксперименты показали, что после применения эплеренона на фоне экспериментального сахарного диабета наблюдались существенные изменения показателей оксидативного повреждения почек в сравнении с контрольной группой (Таблица 8). При этом данные изменения носили во многом противоречивый характер.

Оказалось, что концентрация ТБРП в почках крыс группы эплеренона вопреки предположениям не уменьшилась, а, наоборот, статистически значимо увеличилась в 1,4 раза. При этом активность КАТ в группе эплеренона также статистически значимо возрастала относительно контрольной группы в 1,8 раза. Активность СОД статистически значимо снижалась относительно контрольной

группы 2,4 раза. Активность ГПО статистически значимо увеличилась в 1,5 раза относительно контрольной группы.

Таблица 8 – Показатели активности процесса свободнорадикального окисления в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете в контрольной группе и в группе эплеренона (Ме (25%;75%))

Группа	ТБРП (мкмоль/мг)	КАТ (%)	СОД (%)	ГПО (%)
Контрольная группа	6,0 (4,8;6,6)	32,7 (23,0;37,7)	8,8 (7,7;10,3)	58,7 (57,5;60,3)
Группа эплеренона	8,5 (6,2;9,9)*	60,1 (50,5;64,0)*	3,7 (3,4;5,5)*	89,5 (88,4;91,2)*
Примечание: * – статистически значимо в сравнении с контрольной группой.				

Результаты определения показателей экскреторной функции почек у крыс экспериментальных групп показали, что динамика почечной экскреции глюкозы в обеих группах характеризовалась статистически значимым ростом описываемого показателя на протяжении всех 8 недель, вследствие чего к концу эксперимента в контрольной группе его значение превышало исходный уровень в 2,7 раза, а в группе эплеренона – в 4,5 раза (Таблица 9). Статистически значимых межгрупповых различий не зафиксировано.

Динамика почечной экскреции креатинина была в целом аналогична: в обеих группах статистически значимое превышение исходного уровня в течение всех 8 недель и отсутствие межгрупповых различий (Таблица 9).

Иная картина характеризовала динамику почечной экскреции белка (Таблица 9). В процессе моделирования сахарного диабета в течение первых четырех недель эксперимента в обеих группах возникал последовательный рост экскреции белка с мочой относительно исходного уровня: в контрольной группе – в 4,6 раза, в группе эплеренона – в 3,4 раза. Статистически значимых межгрупповых различий не наблюдалось.

Таблица 9 – Показатели экскреторной функции почек крыс при экспериментальном сахарном диабете в контрольной группе и на фоне введения эплеренона (Ме (25%;75%))

Группа	Экскреция глюкозы с мочой (мкмоль/сутки)	Экскреция белка с мочой (мг/сутки)	Экскреция креатинина с мочой (мкмоль/сутки)
Исходный уровень			
Контрольная группа	4,3 (3,4;4,4)	2,7 (1,8;8,7)	19,8 (13,1;62,9)
Группа эплеренона	3,3 (3,1;3,9)	3,0 (0,6;3,8)	17,4 (8,5;24,8)
1 неделя			
Контрольная группа	9,8 (7,3;11,0)*	5,8 (1,7;14,9)	101,4 (71,3;125,1)*
Группа эплеренона	10,9 (9,4;11,4)*	8,2 (5,9;11,3)*	105,1 (72,3;145,7)*
2 неделя			
Контрольная группа	9,3 (6,0;14,3)*	9,3 (8,1;11,5)*	69,7 (56,9;171,9)*
Группа эплеренона	5,5 (4,6;7,4)*	11,0 (7,7;13,6)*	60,4 (45,9;66,7)*
3 неделя			
Контрольная группа	8,7 (5,0;12,8)*	13,2 (6,2;20,5)*	78,5 (48,2;153,5)*
Группа эплеренона	10,0 (6,2;13,9)*	16,0 (5,8;114,8)*	91,0 (77,7;152,0)*
4 неделя			
Контрольная группа	12,0 (8,2;13,9)*	11,0 (5,9;15,3)*	67,0 (52,2;79,4)*
Группа эплеренона	10,2 (8,0;13,1)*	10,2 (9,9;13,4)*	76,5 (66,5;132,0)*
5 неделя			
Контрольная группа	10,7 (7,1;16,2)*	4,8 (2,2;6,2)	112,6 (59,4;152,1)*
Группа эплеренона	6,9 (4,3;8,7)*	8,2 (4,3;15,2)*	78,1 (49,3;93,1)*
6 неделя			
Контрольная группа	13,7 (9,6;6,5)*	11,6 (5,3;14,8)	93,5 (62,7;140,3)*
Группа эплеренона	11,2 (7,3;13,6)*	5,0 (3,2;7,5)#	64,8 (50,0;81,2)*

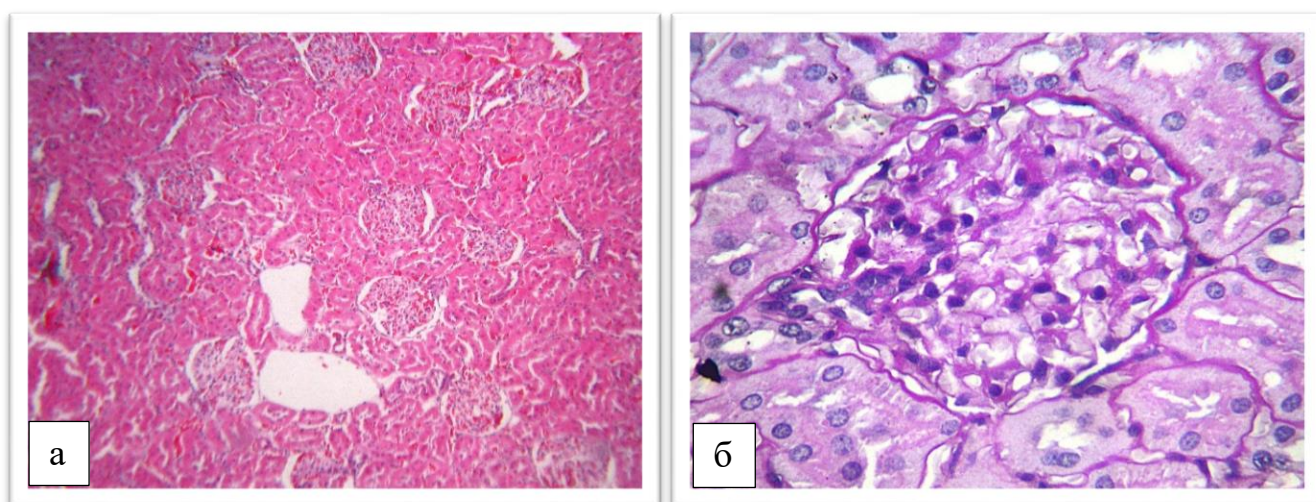
Продолжение Таблицы 9

Группа	Экскреция глюкозы с мочой (мкмоль/сутки)	Экскреция белка с мочой (мг/сутки)	Экскреция креатинина с мочой (мкмоль/сутки)
7 неделя			
Контрольная группа	7,1 (3,6;11,2)*	13,8 (11,6;16,0)*	39,1 (17,6;50,3)
Группа эплеренона	11,0 (5,6;13,7)*	7,7 (2,6;10,3)#	40,6 (26,5;52,4)*
8 неделя			
Контрольная группа	11,5 (10,5;13,1)*	36,0 (28,6;43,2)*	35,3 (30,0;40,9)
Группа эплеренона	14,8 (8,5;16,0)*	9,0 (3,5;15,0)*#	45,7 (33,9;57,6)*
Примечание: * – статистически значимо в сравнении с исходным уровнем. # – статистически значимо в сравнении с контрольной группой.			

Затем в период с 6-й по 8-ю недели в контрольной группе наблюдался дальнейший рост почечной экскреции белка, в результате чего к концу эксперимента она достигала своего максимума, превышая исходный уровень в 13,3 раза.

В группе эплеренона на фоне введения препарата дальнейшего увеличения экскреции белка с мочой зафиксировано не было (Таблица 10). Как следствие, величина описываемого показателя на 6-й, 7-й и 8-й неделе была статистически значимо меньше, чем в контрольной группе, в 2,3, 1,8 и 4 раза соответственно.

Согласно результатам морфологических исследований, в контрольной группе было выявлено увеличение размеров клубочков почек (Рисунок 23а), расширение пространства между капиллярами за счет ШИК-позитивного материала (Рисунок 23б). Также наблюдалось сужение просвета капилляров при утолщении базальных мембран и капсулы клубочков. Выявлялись увеличенные подоциты, имевшие набухшие ядра. Интерстициальное пространство почек содержало нефросклеротические очаги с утолщением базальных мембран канальцев. Нефроны находились преимущественно в состоянии гиалиново-капельной дистрофии, являлись уплощенными при расширении просвета канальцев. Фиксировалась лимфо-плазмоцитарная инфильтрация на некоторых участках.

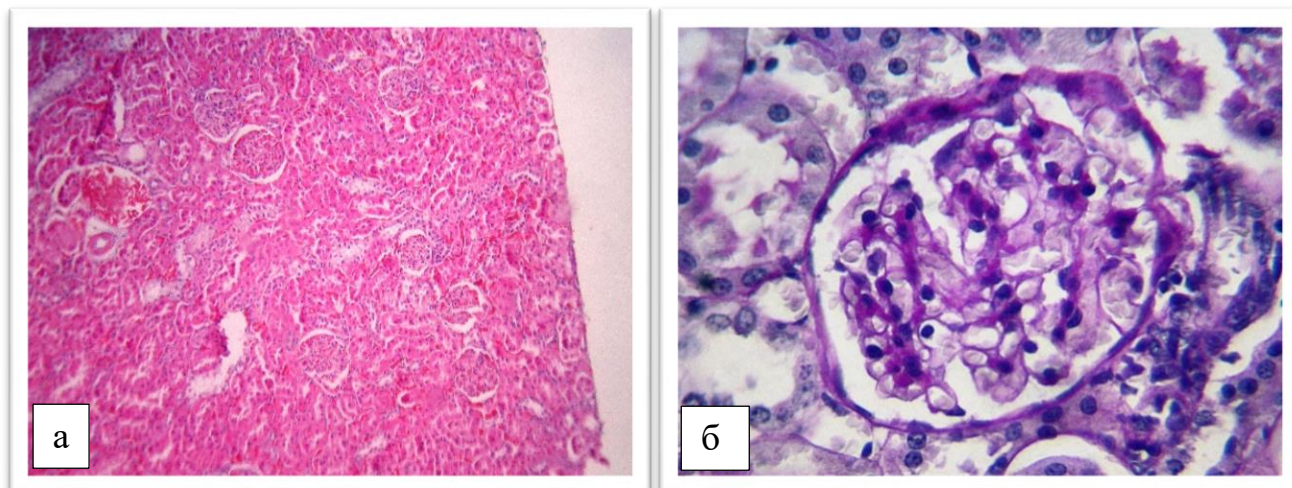


Примечание: 23а – почечные клубочки увеличены. Окраска гематоксилином и эозином, x100
 23б – мезангиум расширен, просвет капилляров клубочка сужен. Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу, x1200.

Рисунок 23 – Патоморфологическая картина клубочка почки в контрольной группе

В результате четырехнедельного введения эплеренона наблюдалось уменьшение площади клубочков почек (Рисунок 24а). Фиксировалось слабо выраженное увеличение пространства между капиллярами и накопление ШИК-положительного материала. Капилляры были полнокровны, имели преимущественно широкий просвет (Рисунок 24б). Подоциты имели небольшой размер, а также мелкие ядра округлой формы. Нефросклеротические изменения интерстиция были минимальны. Нефроциты имели в целом нормальное морфологическое строение при отсутствии на большинстве участков явлений гиалиново-капельной дистрофии.

Морфометрический анализ состояния клубочков почек экспериментальных животных показал, что их площадь в группе эплеренона статистически значимо в 1,6 раза была меньше, чем в контрольной группе (Таблица 11). Средняя площадь просвета капилляров увеличилась в 1,3 раза. Количество подоцитов на фоне введения эплеренона статистически значимо увеличилась относительно контрольной группы в 1,6 раза.



Примечание: 24а – уменьшение размеров почечных клубочков. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$ 24б – увеличение просвета капилляров, уменьшение мезангиума. Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу, $\times 1200$.

Рисунок 24 – Патоморфологическая картина клубочка почки в группе эплеренона

Таблица 11 – Показатели морфометрии почечных клубочков крыс контрольной группы и группы эплеренона ($M \pm m$)

Группа	Площадь почечных клубочков (мкм^2)	Суммарная площадь сосудов в клубочке (мкм^2)	Площадь просвета капилляров клубочка (мкм^2)	Площадь мезангия в клубочках (мкм^2)	Подоциты (количество)
Контрольная группа	$7758,65 \pm 329,5$	$1148,5 \pm 107,65$	$24,25 \pm 1,65$	$5609,9 \pm 823,1$	$7,4 \pm 0,6$
Подопытная группа	$4810,4 \pm 202,6^*$	$1569,65 \pm 282,05$	$31,4 \pm 2,4^*$	$3733,3 \pm 505,9$	$11,8 \pm 0,5^*$

Примечание: * – статистически значимо в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, изучение влияния эплеренона на оксидативное повреждение почек и экскреторную функцию почек при экспериментальном сахарном диабете показало, что препарат проявил нефропротекторное действие, которое, однако, не было связано с антиоксидантной активностью. Выраженность оксидативного стресса в почках крыс после курса применения эплеренона, напротив, увеличилась. Вероятно, это можно объяснить компенсаторным ростом продукции альдостерона и увеличением его количества в почках [88]. Альдостерон в условиях блокады минералокортикоидных рецепторов проявляет негеномную активность в виде мембранных эффектов [144]. Одним из таких эффектов, как известно, является

активация протеинкиназы С [68]. Этот фермент запускает каскад реакций образования АФК [34].

В то же время, блокатор минералокортикоидных рецепторов эплеренон при длительном введении может ослаблять геномные эффекты альдостерона. Основная причина развития протеинурии при ДН – уменьшение количества и ослабление функций подоцитов [34]. Многочисленные исследования свидетельствуют о прямой связи активации минералокортикоидных рецепторов с повреждением подоцитов [30]. В проведенном исследовании при экспериментальном сахарном диабете эплеренон препятствовал снижению количества подоцитов и их повреждению, что сопровождалось ослаблением протеинурии.

3.2.3 Изучение влияния ингибитора образования конечных продуктов гликирования карнозина на оксидативное повреждение и функцию почек при экспериментальном сахарном диабете

Изучение влияния карнозина на выраженность оксидативного стресса в почках крыс с экспериментальным сахарным диабетом показало, что концентрация ТБРП в группе карнозина была статистически значимо ниже уровня крыс контрольной группы в 1,5 раза (Таблица 12). Кроме того, наблюдалось статистически значимое увеличение ОАА в 2,2 раза и рост активности КАТ на 20,4%. Уровень ОПА, а также активность СОД и ГПО не имели статистически значимых межгрупповых различий (в таблице не представлено).

Параллельно наблюдались характерные изменения экскреторной функции почек у крыс, получавших карнозин, в сравнении с контрольной группой (Таблица 13). Оказалось, что концентрация глюкозы в моче в первые 4 недели моделирования сахарного диабета в обеих экспериментальных группах статистически значимо возрастала относительно исходного уровня: в контрольной группе – в 2,5 раза к 28 дню, в группе карнозина – в также в 2,5 раза.

Таблица 12 – Показатели активности процесса свободнорадикального окисления в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете в контрольной группе и в группе карнозина (Ме (25%;75%))

Группа	ТБРП (мкмоль/мг)	ОАА (%)	КАТ (%)
Контрольная группа	6,2 (5,4;7,2)	30,1 (22,8;39,7)	10,3 (5,9;12,1)
Группа карнозина	4,2* (2,2;4,7)	66,4* (64,6;69,2)	12,4* (11,1;13,6)

Примечание: * – статистически значимо в сравнении с контрольной группой.

В дальнейшем в контрольной группе концентрация глюкозы в моче оставалась на прежнем высоком уровне, тогда как в группе карнозина на фоне применения препарата она снижалась. Как следствие, на 7-ю и 8-ю недели величина описываемого показателя статистически значимо уступала уровню крыс контрольной группы в 3,4 раза и в 10,2 раза соответственно.

Помимо этого, в группе карнозина при применении препарата наблюдалось уменьшение концентрации белка в моче (Таблица 13). В период с 5-й по 8-ю недели величина данного показателя последовательно снижалась, в результате чего к концу эксперимента она была статистически значимо меньше, чем в контрольной группе в 3,5 раза.

Проведенное морфологическое исследование показало, что в контрольной группе в почечных клубочках было выявлено расширение межкапиллярного пространства за счет разрастания ШИК-позитивной соединительной ткани и увеличения площади мезангия. Просветы капилляров клубочков были сужены, базальные мембраны капилляров утолщены. Капсулы клубочков были утолщены. Подоциты увеличены в размерах, с набухшими ядрами. В интерстиции почки встречались очаги нефросклероза, в таких участках отмечались утолщенные базальные мембраны канальцев. Нефроциты канальцев были уплощены, просвет канальцев расширен. Канальцы были кистозно расширены. Большинство нефроцитов находилось в состоянии гиалиново-капельной дистрофии.

Таблица 13 – Показатели экскреторной функции почек крыс при экспериментальном сахарном диабете в контрольной группе и на фоне введения карнозина (Ме (25%;75%))

Группа	Концентрация глюкозы в моче (ммоль/л)	Концентрация белка в моче (г/л)
Исходный уровень		
Контрольная группа	2,3 (2,1;2,4)	13,3 (11,0;15,9)
Группа карнозина	1,7 (0,9;2,0)	12,5 (10,6;14,9)
1 неделя		
Контрольная группа	24,3 (5,8;42,6)*	11,4 (5,8;16,3)
Группа карнозина	5,1 (2,9;11,1)*	17,9 (11,6;23,0)
2 неделя		
Контрольная группа	4,8 (3,1;21,2)*	13,5 (9,6;19,2)
Группа карнозина	3,4 (2,5;5,0)*	10,1 (5,4;17,8)
3 неделя		
Контрольная группа	4,9 (3,0;21,7)*	14,5 (11,3;26,3)
Группа карнозина	3,3 (2,5;6,0)*	11,4 (6,0;16,0)
4 неделя		
Контрольная группа	5,7 (3,2;15,9)*	12,1 (7,9;18,5)
Группа карнозина	4,3 (3,0;6,1)*	14,8 (8,5;17,3)
5 неделя		
Контрольная группа	3,3 (2,1;24,0)	9,0 (7,0;12,1)
Группа карнозина	2,1 (1,2;3,2)	8,6 (4,1;11,5)*

Продолжение Таблицы 13

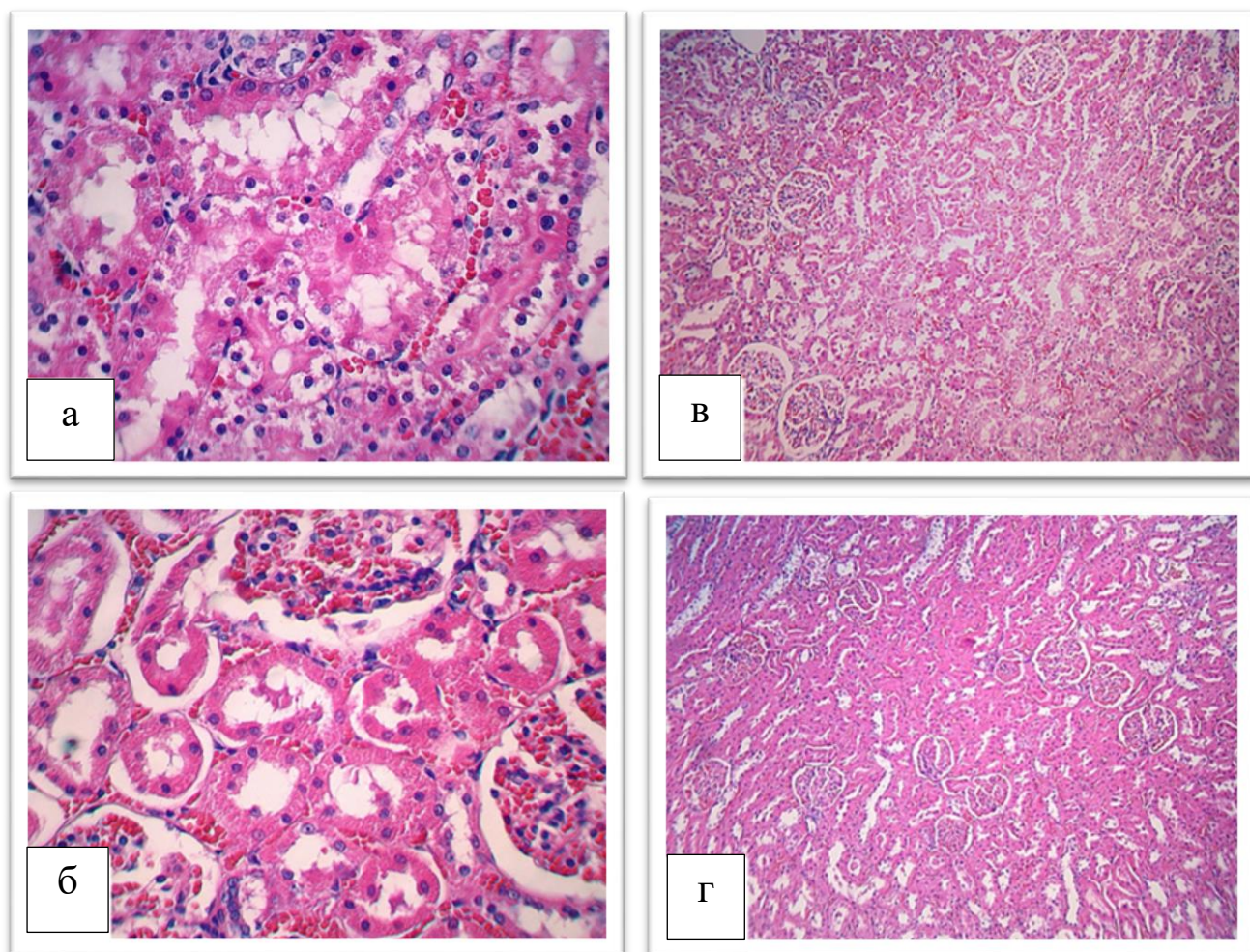
6 неделя		
Контрольная группа	5,8 (1,3;26,0)	11,4 (8,9;16,3)
Группа карнозина	2,1 (0,9;3,2)	6,4 (3,7;11,5)*
7 неделя		
Контрольная группа	4,4 (2,5;28,4)*	11,4 (10,2;14,1)
Группа карнозина	1,3 (0,3;2,7)#	3,5 (2,2;7,9)*#
8 неделя		
Контрольная группа	4,1 (1,8;26,8)	11,7 (5,9;14,8)
Группа карнозина	0,4 (0,2;1,5)*#	3,3 (2,3;5,9)*#
Примечание:* – статистически значимо в сравнении с исходным уровнем. # – статистически значимо в сравнении с контрольной группой.		

На некоторых участках определялась лимфо-плазмацитарная инфильтрация. Гистологическая картина выявленных изменений представлена на рисунке 25.

На этом фоне, как это следует из того же рисунка 25, в почечных клубочках крыс группы карнозина было выявлено слабо выраженное очаговое расширение межкапиллярного пространства и незначительное отложение ШИК-позитивного материала в мезангии. Просветы капилляров клубочков преимущественно были широкими, отмечалось полнокровие капилляров. Подоциты были небольшого размера, с округлыми ядрами небольшого размера. В интерстиции почки явления нефросклероза были минимальны. Морфологическое строение нефроцитов приближалось к норме, явления гиалиново-капельной дистрофии на большинстве участков отсутствовали.

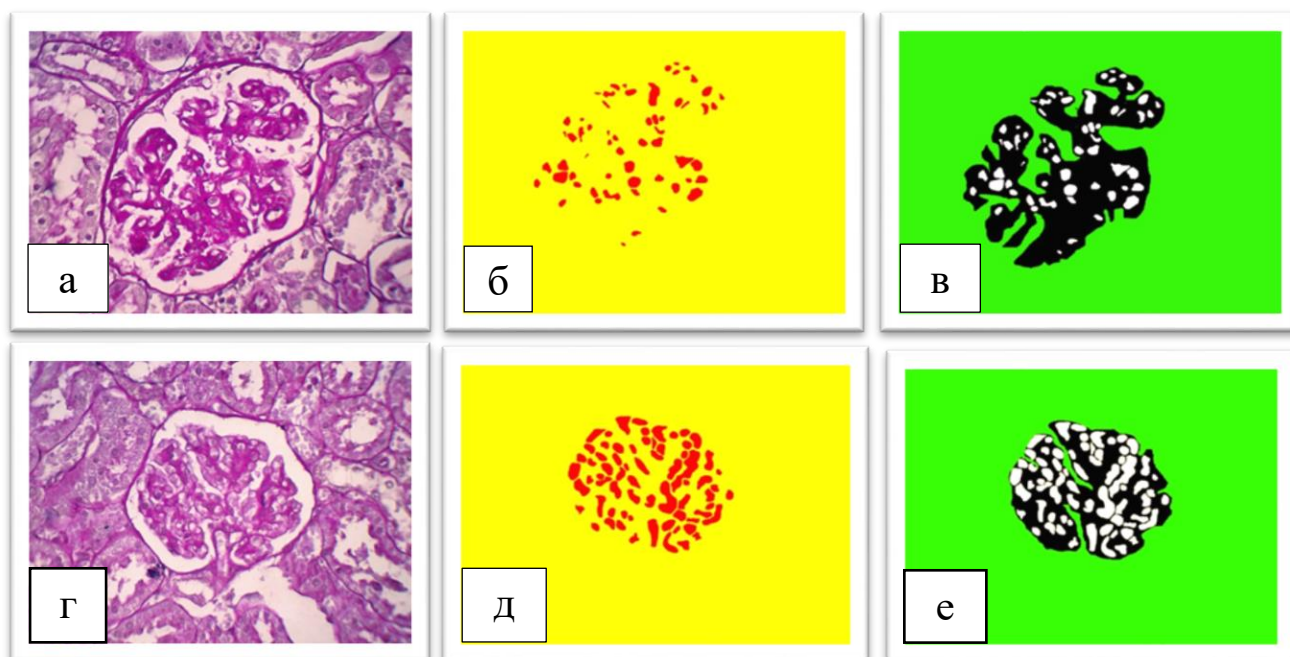
При проведении морфометрии, результаты которой представлены в таблице 14, было выявлено статистически значимое уменьшение площади почечных клубочков у крыс группы карнозина (Рисунок 25) относительно контрольной группы (Рисунок 25) в 1,6 раза. Площадь мезангия в клубочках на фоне применения карнозина также снижалась в 1,6 раза (Рисунок 26). При этом в контрольной группе было зафиксировано разрастание ШИК-позитивной ткани в клубочках (Рисунок 26),

которое в подопытной группе было незначительным (Рисунок 26). Кроме того, суммарная площадь сосудистого русла и площадь 1 капилляра в почечных клубочках крыс, получавших карнозин (Рисунок 26), статистически значимо увеличились относительно контрольной группы (Рисунок 26) в 2,4 и 1,9 раза соответственно. Количество подоцитов в клубочках крыс группы карнозина было больше, чем в контрольной группе, в 1,9 раза.



Примечание: 25а – ув.×400, гиалиново-капельная дистрофия нефроцитов в контрольной группе крыс; 25б – ув.×400, отсутствие дистрофических изменений в группе карнозина; 25в – ув.×100, контрольная группа крыс, клубочки увеличены в размерах; 25г – ув.×100, группа карнозина, размеры клубочков уменьшены.

Рисунок 25 – Ткань почек экспериментальных крыс. Окраска гематоксилином и эозином



Примечание: 26а – ШИК-реакция по Мак-Манусу, контрольная группа; 26б – капилляры клубочка (красные) в контрольной группе; 26в – мезангиум клубочка (черный) в контрольной группе; 26г – ШИК-реакция по Мак-Манусу группа карнозина; 26д – капилляры клубочка (красные) в группе карнозина, 26е – мезангиум клубочка (черный) в группе карнозина. Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу и компьютерная обработка микрофотографий. х 400.

Рисунок 26 – Компьютерный анализ площади сосудов и мезангия в почечных клубочках крыс экспериментальных групп

Таблица 14 – Показатели морфометрии почечных клубочков крыс контрольной группы и группы карнозина ($M \pm m$)

Группа	Площадь почечных клубочков (мкм ²)	Суммарная площадь сосудов в клубочке (мкм ²)	Площадь просвета капилляров клубочка (мкм ²)	Площадь мезангия в клубочках (мкм ²)	Подоциты (количество)
Контрольная группа	10470,5±735,6	1289,4±109,8	24,0±1,2	7158,2±858,8	9,2±1,0
Группа карнозина	6447,2±309,6*	3064,2±29,8*	45,8±2,0*	4452,3±304,6*	17,8±1,4*

Примечание: * – статистически значимо в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, по результатам проведенного исследования установлено, что длительное применение карнозина в условиях экспериментального стрептозотоцинового сахарного диабета сопровождалось уменьшением активности процесса свободнорадикального окисления в почках, ослаблением повреждения почечных клубочков, нормализацией структуры и количества подоцитов и снижением концентрации белка в моче.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопрос повышения эффективности лечения сахарного диабета и его осложнений в последние годы становится все более актуальной медицинской проблемой. Одним из критических осложнений сахарного диабета, как уже отмечалось, является диабетическая нефропатия [11]. Диабетическая нефропатия – это почечное осложнение, связанное с сахарным диабетом, встречающееся примерно у 40% пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) и у 30% пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1) [21,35]. Поскольку число людей с сахарным диабетом продолжает расти во всем мире, распространенность диабетической нефропатии также увеличивается [56,210,254].

Сегодня принято считать, что ключевой причиной развития диабетической нефропатии является повреждение подоцитов [153,191]. Как известно, подоциты – это специализированные клетки, необходимые для сохранения целостности и функционирования клубочкового фильтрационного барьера, который имеет решающее значение для функционирования почек [74,109]. Выделяют целый ряд возможных факторов, определяющих развитие подоцитопатии при сахарном диабете, один из которых – развитие оксидативного стресса в почках и повреждение подоцитов активными формами кислорода [129,204]. В этой связи антиоксидантная терапия сегодня является одной из важных стратегий фармакологической коррекции диабетической нефропатии.

Несмотря на достигнутые успехи в указанном направлении, проблема поиска новых эффективных и безопасных лекарственных средств для нефропротекции при сахарном диабете сохраняет свою высокую актуальность [121]. В проведенном нами исследовании, опираясь на современные представления о механизмах развития оксидативного повреждения почек при сахарном диабете [34], была поставлена цель определить наиболее перспективный патогенетически обоснованный путь фармакологической коррекции диабетической нефропатии для

будущей разработки новых высокоэффективных антиоксидантных нефропротекторов.

На первом этапе исследования необходимо было воспроизвести экспериментальную модель сахарного диабета и изучить основные биохимические и морфологические признаки повреждения почек для подтверждения развития нефропатии и дальнейшей оценки эффективности использованных в эксперименте лекарственных препаратов. Для этого нами была использована стрептозотоциновая модель сахарного диабета [16].

Было установлено, что при моделировании патологии в течение 4-х недель наблюдалось существенное увеличение экскреции глюкозы с мочой, что подтверждало развитие экспериментального сахарного диабета и гиперглюкозурии. Параллельно фиксировался значительный рост почечной экскреции белка и креатинина – свидетельство развития повреждения почечного клубочка и протеинурии.

Важно, что описанные признаки нарушения экскреторной функции почек сопровождались развитием оксидативного стресса в почечной ткани крыс, что подтверждалось характерными изменениями прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках экспериментальных животных.

Так, наблюдался статистически значимый рост концентрации ТБРП в почечной ткани крыс с экспериментальным сахарным диабетом в сравнении с интактными животными. Как известно, основным веществом, относящимся к ТБРП, является малоновый диальдегид [4]. Малоновый диальдегид – один из основных продуктов перекисного окисления мембранных фосфолипидов [28], поэтому зафиксированный нами рост концентрации ТБРП следует расценивать как характерный признак активации процесса свободнорадикального окисления в почках на фоне экспериментального сахарного диабета. Параллельно с этим происходило увеличение ОПА – интегративного показателя, который соответствует сумме всех прооксидантов и свободнорадикальных метаболитов, рост его также указывает на усиление процессов окисления.

На этом фоне наблюдались характерные изменения активности антиоксидантных ферментов – СОД, КАТ и ГПО. Как известно, функции данных ферментов заключаются в нейтрализации наиболее агрессивных активных форм кислорода – супероксид-радикала, пероксида водорода и гидроксильного радикала соответственно (Рисунок 27) [15,178].

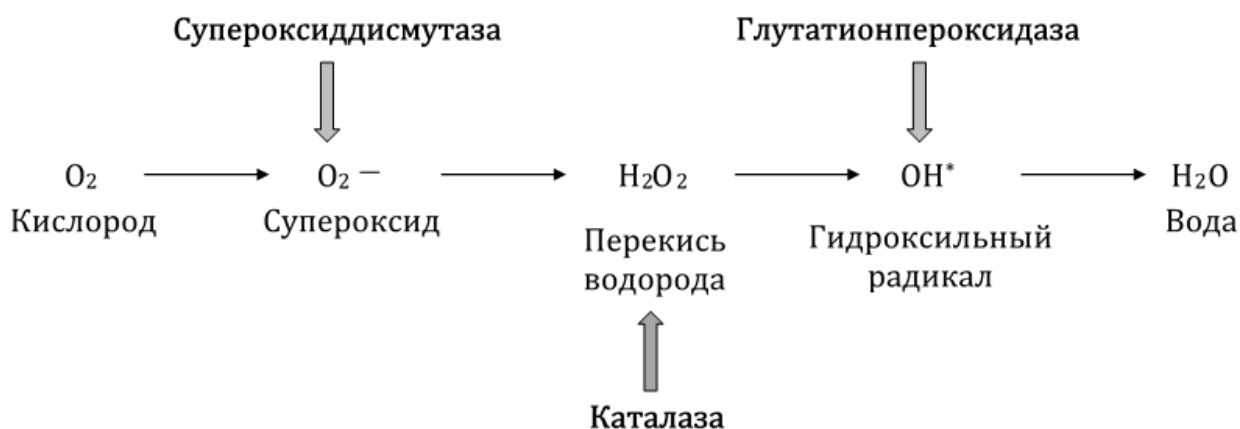


Рисунок 27 – Схема генерации активных форм кислорода и основные точки приложения антиоксидантных ферментов

В наших экспериментах было зафиксировано, что в условиях четырехнедельного моделирования сахарного диабета активность СОД статистически значимо возросла, активность КАТ – снизилась, активность ГПО – возросла. Данные изменения, по-видимому, являются компенсаторными, а общая картина происходящих процессов нам представляется следующей.

Первоначально увеличивается продукция супероксидного радикала. Это приводит к субстратной стимуляции активности СОД, которая восстанавливает O_2^- до пероксида водорода, приводя к его накоплению. Далее КАТ, выполняя свою функцию, расщепляет H_2O_2 до кислорода и воды. Как известно, для каталазы характерно явление, получившее название «suicide inactivation», суть которого заключается в истощении активности фермента на фоне выраженного накопления его субстрата [190]. По всей видимости, именно этим можно объяснить наблюдаемое снижение активности КАТ. Наконец, рост активности ГПО также мог

быть обусловлен субстратной стимуляцией в ответ на накопление гидроксильного радикала.

Окончательным подтверждением развития повреждения почек в условиях моделирования экспериментального сахарного диабета стали результаты морфологического исследования, которые подтвердили наличие главного признака нефропатии – нарушение структуры и функции подоцитов и снижение их количества. Наряду с этим также наблюдалось увеличение размера почечных клубочков, расширение межкапиллярного пространства и мезангия, уменьшение количества, площади просветов и средней суммарной площади капилляров в клубочках.

Таким образом, была подтверждена корректность моделирования стрептозотоцинового сахарного диабета с формированием характерных признаков нефропатии в течение 4-х недель.

Вместе с тем, существует мнение, что стойкая нефропатия развивается при длительном моделировании в течение нескольких месяцев. Поэтому мы решили смоделировать сахарный диабет продолжительностью 8 месяцев, изучить биохимическую и морфологическую картину повреждения почек на данных сроках и сравнить ее с картиной нефропатии при экспериментальном сахарном диабете продолжительностью 4 недели.

Оказалось, что у крыс после 8 месяцев моделирования сахарного диабета картина течения почечной патологии значительно усугублялась. В первую очередь необходимо отметить тот факт, что при проведении морфологического исследования подоциты в почках не выявлялись, нормальные тканевые структуры почечного сосочка заменялись массивным разрастанием соединительной ткани. Кроме того, фиксировалось усиление гипергликозурии относительно четырехнедельного экспериментального сахарного диабета, а также истощение ресурсов систем, регулирующих прооксидантные и антиоксидантные процессы.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что модель 8-месячного экспериментального сахарного диабета не подходит для решения поставленных в настоящем исследовании задач, т.к. приводит к формированию тяжелой

необратимой формы нефропатии, которая, по-видимому, не поддается фармакологической коррекции.

В совокупности полученные на первом этапе исследования результаты позволили определить оптимальную схему изучения нефропротекторной эффективности лекарственных препаратов: моделирование экспериментального сахарного диабета в течение 4-х недель с последующим введением препаратов на протяжении еще 4-х недель.

Как уже было отмечено ранее, выделяют 3 основных пути развития оксидативного повреждения почек при сахарном диабете:

- прямое прооксидантное действие глюкозы и ее метаболитов;
- активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы;
- образование конечных продуктов гликирования.

Поэтому для решения поставленных в исследовании задач, на втором этапе нами в качестве фармакологических «инструментов» были выбраны лекарственные препараты α -токоферола ацетат, эплеренон и карнозин и изучена их нефропротекторная активность.

α -токоферола ацетат – хорошо известный прямой антиоксидант [18,40,147]. Мощные антиоксидантные свойства α -токоферола ацетата лежат в основе его применения как лекарственного препарата в лечении различных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, рак, болезнь Альцгеймера, атеросклероз и др. [207]. Известна эффективность α -токоферола ацетата и в лечении некоторых почечных патологий [78]. Также следует отметить, что ранее на кафедре фармакологии Алтайского государственного медицинского университета была показана эффективность применения α -токоферола ацетата в коррекции экспериментальной мочекаменной болезни [10,13,14]. Поэтому в проведенном нами исследовании логично было ожидать наличие нефропротекторного эффекта данного препарата при экспериментальном сахарном диабете за счет его антиоксидантных свойств. Однако результаты проведенных экспериментов опровергли данное предположение. С одной стороны, наблюдался выраженный антиоксидантный эффект, о чем свидетельствовало пятикратное

снижение концентрации ТБРП в почках подопытных крыс в сравнении с контролем заболевания. Но при этом нефропротекторного эффекта не возникало – показатели глюкозурии, протеинурии, структурного и функционального состояния почечного клубочка после применения α -токоферола ацетата не отличались от таковых в контрольной группе. Полученные результаты позволяют предположить, что подавление прямого компонента оксидативного эффекта глюкозы и продуктов ее метаболизма недостаточно для нормализации структуры и функции почечного фильтрационного барьера. Возможно, опосредованные механизмы оксидации вносят гораздо более существенный вклад в развитие нефропатии.

При изучении влияния эплеренона на течение оксидативного повреждения почек при экспериментальном сахарном диабете был выявлен выраженный нефропротекторный эффект. Оказалось, что количество подоцитов в сравнении с контрольной группой значительно увеличилось при сопутствующей нормализации их структуры и функции. Кроме того, значительно улучшалось состояние сопутствующих тканевых структур почечного клубочка. Все это логично сопровождалось существенным ослаблением протеинурии в сравнении с контрольной группой.

Полученные результаты хорошо согласуются с различными источниками, описывающими благоприятное влияние эплеренона на течение патологий почек. Так, было показано, что введение эплеренона ослабляет фиброз почек путем ингибирования экспрессии TGF- β и коллагена IV у крыс с гипертоническим диабетом [123]. Кроме того, было продемонстрировано, что эплеренон снижает протеинурию, предотвращая повреждение подоцитов и гломерулосклероз у крыс, получавших солевую гипертензию по методу Даля [223]. Сообщалось, что эплеренон уменьшает протеинурию у крыс, не подвергшихся нефрэктомии, при инфузии альдостерона путем снижения уровня SGK1 и последующего повышения активности NADPH-оксидазы в подоцитах [193]. Также было продемонстрировано, что эплеренон ингибирует пролиферацию мезангиальных клеток, которая опосредуется индуцированной высоким содержанием глюкозы активацией большой митоген-активируемой протеинкиназы 1 (BMK1) [128]. Наконец, ряд

клинических наблюдений показали наличие антипротеинурического действия эплеренона при его применении при сахарном диабете 2 типа [70,71].

Однако при этом важно отметить, что результаты проведенных нами экспериментов показали, что выраженность оксидативного стресса в почечной ткани крыс, получавших эплеренон, в сравнении с контролем заболевания не снижается, а, наоборот, увеличивается. Это было во многом неожиданно, и свидетельствовало о том, что механизм нефропротекторного действия эплеренона не связан с влиянием на активность процесса свободнорадикального окисления в почках.

На наш взгляд, усиление оксидативного стресса в почках можно объяснить следующим образом. Современные исследования показывают, что на фоне применения блокаторов минералокортикоидных рецепторов может происходить компенсаторное усиление продукции ренина, ангиотензина II и альдостерона [88]. На фоне блокады своих цитозольных рецепторов альдостерон в большей степени проявляет негеномные мембранные эффекты, в том числе – активирует протеинкиназу C, запуская каскад реакций образования активных форм кислорода [34,68,144].

Нефропротекторное действие эплеренона при сахарном диабете, по-видимому, определяется ослаблением геномных эффектов альдостерона. Известно, что повреждение подоцитов напрямую зависит от активации минералокортикоидных рецепторов [30].

На завершающем этапе проведенного нами исследования было изучено влияние ингибитора образования конечных продуктов гликирования карнозина на течение оксидативного повреждения почек при экспериментальном сахарном диабете.

Установлено, что в результате проведенного лечения:

- 1) Количество подоцитов существенно выше, чем в контрольной группе. Их структура и функции нормализуются. Повреждение почечных клубочков ослабляется.

2) Активность процесса свободнорадикального окисления в почках существенно снижается относительно контрольной группы.

3) Концентрация белка и глюкозы в моче уменьшается.

Как известно, карнозин ингибирует образование конечных продуктов гликирования, которые представляют собой скопление гетерогенных молекул, образующихся в результате неферментативной реакции связывания сахаров с аминогруппами ДНК, липидами и белками [81]. Принято считать, что в основе данного действия лежит способность карнозина ингибировать карбонилирование и гликоксидацию белков [81]. Экспериментально показана способность карнозина снижать активность процесса свободнорадикального окисления и ослаблять образование конечных продуктов гликирования в крови крыс на фоне экспериментального стрептозотоцинового сахарного диабета [29]. В проведенном нами исследовании были получены схожие результаты: концентрация ТБРП в почках крыс, получавших карнозин, статистически значимо снизилась в 1,5 раза в сравнении с контрольной группой, а ОАА и активность каталазы возросли в 1,2 раза. Это позволяет предположить, что в наших экспериментах карнозин также проявил антигликативные и антиоксидантные свойства, результатом чего стало ослабление оксидативного стресса в почках крыс группы карнозина.

Важно отметить, что в этих условиях были зафиксированы отчетливые морфологические признаки облегчения протекания нефропатии. В первую очередь об этом свидетельствовало двукратное увеличение количества подоцитов в почках крыс, получавших карнозин, в сравнении с контрольной группой, а также нормализация структуры почечного клубочка. Данные изменения логично сопровождалось снижением концентрации белка в моче.

Также следует добавить, что в моче крыс, получавших карнозин, было зафиксировано снижение концентрации глюкозы. Это было несколько неожиданно, однако в литературе встречаются сведения, что карнозин при сахарном диабете, нейтрализуя глюколипотоксичные радикалы, усиливает секрецию инсулина и поглощение глюкозы [54]. Кроме того, установлено, что

карнозин защищает β -клетки поджелудочной железы от оксидативного повреждения [143].

Таким образом, суммируя вышеизложенное, отметим – в результате проведенного исследования продемонстрировано, что наиболее перспективным патогенетически обоснованным направлением фармакологической коррекции диабетической нефропатии для будущей разработки новых высокоэффективных антиоксидантных нефропротекторов является ингибирование образования конечных продуктов гликирования (Рисунок 28). Прямое антиоксидантное действие и ослабление активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы носят, как минимум, не однозначный и во многом противоречивый характер. В первом случае на фоне явно выраженного подавления оксидативного стресса в почках отсутствовал нефропротекторный эффект, во втором – нефропротекторный эффект имел место, но активность процесса свободнорадикального окисления не снижалась, а возрастала.

Разумеется, проблема лечения диабетической нефропатии носит очень сложный и многогранный характер, однако результаты проведенного исследования позволяют определить наиболее перспективное направление разработки и изучения эффективности новых антиоксидантных нефропротекторов.

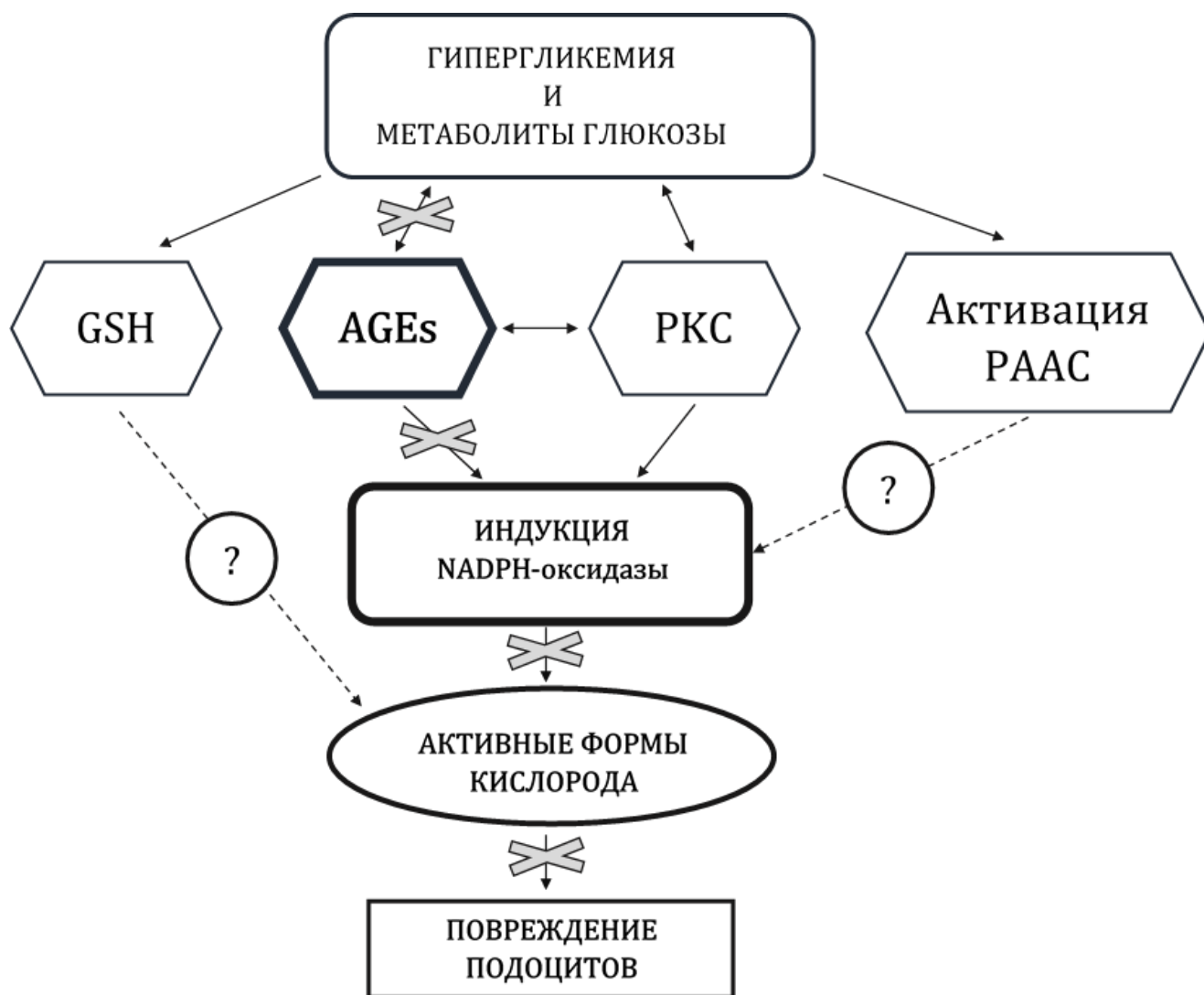


Рисунок 28 – Наиболее перспективное патогенетически обоснованное направление фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек при сахарном диабете (ингибирование образования конечных продуктов гликирования)

ВЫВОДЫ

1. При моделировании экспериментального сахарного диабета в течении 4-х недель возникает протеин- и глюкозурия, оксидативный стресс. В почечном клубочке уменьшается количество подоцитов и развиваются сопутствующие патоморфологические изменения. Это позволяет использовать четырехнедельный вариант стрептозотоциновой модели сахарного диабета для оценки эффективности фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек при сахарном диабете.

2. При введении прямого антиоксиданта α -токоферола ацетата происходит ослабление оксидативного стресса в почках крыс с экспериментальным сахарным диабетом (снижение концентрации ТБРП в 5,3 раза), но при этом не возникает нефропротекторного эффекта – высокий уровень экскреции белка с мочой и выраженное повреждение тканей почечного клубочка сохраняются на уровне контрольной группы.

3. Применение ингибитора минералокортикоидных рецепторов эплеренона в условиях экспериментального сахарного диабета значительно ослабляет протеинурию (в 4 раза по сравнению с контрольной группой), а также улучшает морфологические характеристики почечного клубочка. Однако выраженность оксидативного стресса в почках не снижается, а увеличивается (увеличение концентрации ТБРП на 40% относительно контрольной группы).

4. Карнозин обладает антиоксидантным эффектом в почках крыс с экспериментальным сахарным диабетом, нормализует структуру и функцию почечного клубочка, что сопровождается снижением концентрации белка в моче.

5. Наиболее перспективным патогенетически обоснованным направлением фармакологической коррекции оксидативного повреждения почек при сахарном диабете является ингибирование образования конечных продуктов гликирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГПО – глутатионпероксидаза;

ДН – диабетическая нефропатия;

КАТ – каталаза;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

ОПА – общая прооксидантная активность;

ОАА – общая антиоксидантная активность;

СД – сахарный диабет;

ТБРП – тиобарбитуратреактивные продукты

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.
2. Багрий, А.Э. Диабетическая нефропатия: вопросы эпидемиологии, терминологии, патогенеза, клинической картины и лечебной тактики (обзор литературы) / А.Э. Багрий, М.В. Хоменко, О.И. Шверова // Крымский терапевтический журнал. – 2022. – № 1. – С. 15-20.
3. Бобкова, И. Н. Диабетическая нефропатия – фокус на повреждение подоцитов / И.Н. Бобкова, М.В. Шестакова, А.А. Щукина // Нефрология. – 2015. – Т. 19, № 2. – С. 33-44.
4. Брюханов, В.М. Методы доклинического (экспериментального) исследования влияния лекарственных средств на функцию почек / В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов и др. – Новосибирск: Гео, 2013. – 84 с.
5. Гаврилова, А.О. Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе диабетической нефропатии / А.О. Гаврилова, А.С. Северина, М.Ш. Шамхалова, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24, № 5. – С. 461-469.
6. Глухова, А.В. Патогенетические механизмы развития диабетической нефропатии (обзор литературы) / А.В. Глухова, Е.А. Шамрова, К.С. Мадонов, Д.Г. Сардаева // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2024. – Т. 70, № 2. – С. 179-193.
7. Дедов, И.И. Феномен «метаболической памяти» в прогнозировании риска развития сосудистых осложнений при сахарном диабете / И.И. Дедов, М.В. Шестакова // Терапевтический архив. – 2015. – Т. 10. – С. 4-10.
8. Дедов, И.И. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным федерального регистра сахарного диабета / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20, № 1. – С. 13-41.

9. Жариков, А.Ю. Роль антиоксидантной терапии в фармакологической коррекции экспериментального нефролитиаза / А.Ю. Жариков, О.С. Талалаева, Я.Ф. Зверев и др. // Нефрология. – 2010. – Т. 14, № 4. – С. 53-58.
10. Жариков, А.Ю. Влияние альфа-токоферола ацетата на экспрессию внутрипочечных ингибиторов кристаллизации при экспериментальном нефролитиазе / А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин, Я.Ф. Зверев и др. // Медицина в Кузбассе. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 27-31.
11. Жариков, А.Ю. Диабетическая нефропатия. Современный взгляд на проблему / А.Ю. Жариков, Р.О. Щекочихина // Бюллетень медицинской науки. – 2018. – № 2. – С. 24-31.
12. Кальницкий, А.С. Влияние карнозина на течение экспериментального уратного нефролитиаза / А.С. Кальницкий, А.Ю. Жариков, О.Н. Мазко и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 171, № 2. – С. 182-185.
13. Мотина, Н.В. Благоприятное воздействие антиоксидантной терапии на структурную перестройку почки в условиях экспериментального оксалатного нефролитиаза / Н.В. Мотина, В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев Я.Ф. и др. // Нефрология. – 2011. – Т. 15, № 2. – С. 57-61.
14. Мотина, Н.В. Влияние антиоксидантной терапии на развитие стресса эндоплазматической сети при экспериментальном нефролитиазе / Н.В. Мотина, А.В. Лепилов, А.Ю. Жариков, Ю.Г. Мотин // Морфология. – 2014. – Т. 145, № 3. – С. 133-134.
15. Рытикова, О.С. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе непродолжительной ишемии почки в эксперименте / О.С. Рытикова, В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, И.Е. Госсен // Нефрология. – 2004, - Т. 8, № 4. – С. 115-116.
16. Спасов, А.А. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л. Снигур и др. // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 12-18.

17. Хафазиянова, Р.Х. Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии / Р.Х. Хафизьянова, И.М. Бурыкин, Г.Н. Алеева. – Казань: Медицина, 2006. – 374 с.
18. Чепур, С.В. Механизмы реализации антиоксидантных эффектов альфа-токоферола / С.В. Чепур, Н.Н. Плужников, С.А. Сайганов и др. // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 2. – С. 149-165.
19. Abuelo, J.G. Normotensive ischemic acute renal failure / J.G. Abuelo // *N Engl J Med.* – 2007. – Vol. 357, № 8. – P. 797-805.
20. Ahn, J.H. Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on the development of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rats / J.H. Ahn, H.C. Hong, M.J. Cho et al. // *Diabetes Metab J.* – 2012. – Vol. 36, N 2. – P. 128-135.
21. Alicic, R.Z. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities / R.Z. Alicic, M.T. Rooney, K.R. Tuttle // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2017. V. 12, № 12. – P. 2032-2045.
22. Altintas, M.M. Podocytes: way to go / M.M. Altintas, J. Reiser // *Am J Pathol.* – 2019. – Vol. 189. – P. 226-228.
23. Angeloni, C. Role of methylglyoxal in Alzheimer's disease / C. Angeloni, L. Zambonin, S. Hrelia // *Biomed Res Int.* – 2014. – Vol. 2014. – 238485.
24. Arison, R.N. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin / R.N. Arison, E.I. Ciaccio, M.S. Glitzer et al. // *Diabetes.* – 1967. – Vol. 16. – P. 51-56.
25. Arnouts, P. Glucose-lowering drugs in patients with chronic kidney disease: a narrative review on pharmacokinetic properties / P. Arnouts, D. Bolignano, I. Nistor I. et al. // *Nephrology Dialysis Transplantation.* – 2014. – Vol. 29, № 7. – P. 1284-1300.
26. Arora, M.K. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. / M.K. Arora, U.K. Singh // *Vascular Pharmacology.* – 2013. – Vol. 58. – P. 259-271.
27. Arsov, S. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review / S. Arsov, R. Graaff, W. van Oeveren et al. // *Clin Chem Lab Med.* – 2014. – Vol. 52, № 1. – P. 11-20.

28. Ayala, A. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles // *Oxid Med Cell Longev.* – 2014. – 2014:360438.
29. Aydın, A.F. Carnosine decreased oxidation and glycation products in serum and liver of high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced diabetic rats / A.F. Aydın, İ. Bingül, C. Küçükgergin et al. // *Int J Exp Pathol.* – 2017. – Vol. 98, № 5. – P. 278-288.
30. Bai, M. NLRP3 inflammasome activation contributes to aldosterone-induced podocyte injury / M. Bai, Y. Chen, M. Zhao et al. // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2017. – Vol. 312, № 4. – P. F556-F564.
31. Balant, L. Pharmacokinetics of glipizide in man: influence of renal insufficiency / L. Balant, G. Zahnd, A. Gorgia et al. // *Diabetologia.* – 1973. – Vol. 9. – P. 331-338.
32. Bennett, R.A. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin / R.A. Bennett, A.E. Pegg // *Cancer Res.* – 1981. – Vol. 41. – P. 2786-2790.
33. Bettiga, A. The Modern Western Diet Rich in Advanced Glycation End-Products (AGEs): An Overview of Its Impact on Obesity and Early Progression of Renal Pathology / A. Bettiga, F. Fiorio, F. Di Marco et al. // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11, № 8. – P. 1748.
34. Bhatti, A.B. Drug Targets for Oxidative Podocyte Injury in Diabetic Nephropathy / A.B. Bhatt, M. Usman // *Cureus.* – 2015. – Vol. 7, № 12. – P. e393.
35. Bikbov, B. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 / B. Bikbov, C.A. Purcell, A.S. Levey et al. // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395, № 10225. – P. 709-733.
36. Bohlender, J.M. Advanced glycation end products and the kidney / J.M. Bohlender, S. Franke, G. Stein et al. // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2005. – Vol. 289, № 4. – P. F645-659.
37. Boldyrev, A.A. Physiology and pathophysiology of carnosine / A.A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave // *Physiol Rev.* – 2013. – Vol. 93, № 4. – P. 1803-1845.
38. Bondeva, T., Rüster C, Franke S, et al. Advanced glycation endproducts suppress neuropilin-1 expression in podocytes / T. Bondeva, C. Rüster, S. Franke et al. // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 75, № 6. – P. 605-616.

39. Bork, T. Podocytes maintain high basal levels of autophagy independent of mtor signaling / T. Bork, W. Liang, K. Yamahara et al. // *Autophagy*. – 2020. – Vol. 16, № 11. – P. 1932-1948.
40. Brigelius-Flohé, R. Vitamin E: function and metabolism / R. Brigelius-Flohé, M.G. Traber // *FASEB J*. – 1999. – Vol. 13, № 10. – P. 1145-1155.
41. Bucala, R. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging / R. Bucala, A. Cerami A. // *Adv Pharmacol*. – 1992. – Vol. 23. – P. 1-34.
42. Burrows, N.R. Incidence of end-stage renal disease attributed to diabetes among persons with diagnosed diabetes – United States and Puerto Rico, 2000-2014. / N.R. Burrows, I. Hora, L.S. Geiss et al. // *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2017. – Vol. 66. – P. 1165-1170.
43. Busch, M. Advanced glycation endproducts and the kidney / M. Busch, S. Franke, C. Rüster et al. // *Eur J Clin Invest*. – 2010. – Vol. 40, № 8. – P. 742-755.
44. Campbell, K. Inhibition of RAS in diabetic nephropathy / K. Campbell, R. Yacoub // *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*. – 2015. – Vol. 8. – P. 29-40.
45. Cao, Y. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose / Y. Cao, Y. Hao, H. Li et al. // *Int J Mol Med*. – 2014. – Vol. 33, № 4. – P. 809-816.
46. Castedo, M. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition / M. Castedo, J-L Perfettini, T. Roumier et al. // *Oncogene*. – 2004. – Vol. 23, № 16. – P. 2825-2837.
47. Charonis, A.S. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation / A.S. Charonis, L.A. Reger, J.E. Dege et al. // *Diabetes*. – 1990. – Vol. 39, № 7. – P. 807-814.
48. Chawla, T. Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy / T. Chawla, D. Sharma, A. Singh // *World Journal of Diabetes*. – 2010. – Vol. 1, № 5. – P. 141-145.

49. Chen, A. Soluble RARRES1 induces podocyte apoptosis to promote glomerular disease progression / A. Chen, Y. Feng, H. Lai et al. // *J Clin Invest.* – 2020. – Vol. 130, № 10. – P. 5523-5535.
50. Chen, J. EGF receptor deletion in podocytes attenuates diabetic nephropathy / J. Chen, J-K. Chen, R.C. Harris // *J Am Soc Nephrol.* – 2015. – Vol. 26, № 5. – P. 1115-1125.
51. Chen, J. Ginkgolide B alleviates oxidative stress and ferroptosis by inhibiting GPX4 ubiquitination to improve diabetic nephropathy / J. Chen, Z. Ou, T. Gao et al. // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – Vol. 156. – 113953.
52. Chilelli, N.C. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a «glycooxidation-centric» point of view / N.C. Chilelli, S. Burlina, A. Lapolla // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2013. – Vol. 23, № 10. – P. 913-919.
53. Chung, H. Curcumin blocks high glucose-induced podocyte injury via RIPK3-dependent pathway / H. Chung, S-W. Lee, M. Hyun et al. // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. – Vol. 10. – 800574.
54. Cripps, M.J. Carnosine scavenging of glucolipotoxic free radicals enhances insulin secretion and glucose uptake / M.J. Cripps, K. Hanna, C. Lavilla et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 13313.
55. Cunard, R. The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease / R. Cunard, K. Sharma // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2011. – Vol. 300, № 5. – P. F1054-1061.
56. Dagenais, G.R. Variations in diabetes prevalence in low-, middle-, and high-income countries: results from the prospective urban and rural epidemiological study / G.R. Dagenais, H.C. Gerstein, X. Zhang et al. // *Diabetes Care.* – 2016. – Vol. 39, № 5. – P. 780-787.
57. Davidson, M.B. Effect of spironolactone therapy on albuminuria in patients with type 2 diabetes treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors / M.B. Davidson, A. Wong, A.H. Hamrahian et al. // *Endocrine Practice.* – 2008. – Vol. 14, № 8. – P. 985-992.

58. D'Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy / M.S. D'Arcy // *Cell Biol Int.* – 2019. – Vol. 43, № 6. – P. 582-592.
59. de Borst, M.H. Active vitamin D treatment for reduction of residual proteinuria: a systematic review / M.H. de Borst, R. Hajhosseiny, H. Tamez et al. // *Journal of the American Society of Nephrology.* – 2013. – Vol. 24. – P. 1863-1871.
60. De Nicola, L. Sodium/glucose cotransporter 2 inhibitors and prevention of diabetic nephropathy: targeting the renal tubule in diabetes / L. De Nikola, F.B. Gabbai, M.E. Liberti, A. Sagliocca et al. // *American Journal of Kidney Diseases.* – 2014. – Vol. 64, № 1. – P. 16-24.
61. de Zeeuw, D. Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy / D. de Zeeuw, G. Remuzzi, H.H. Parving, W.F. et al. // *Circulation.* – 2004. – Vol. 110, № 8. – P. 921-927.
62. Denhez, B. Increased SHP-1 protein expression by high glucose levels reduces nephrin phosphorylation in podocytes / B. Denhez, F. Lizotte, M-O. Guimond et al. // *J Biol Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 1. – P. 350-358.
63. Dhuriya, Y.K. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death / Y.K. Dhuriya, D. Sharma // *J Neuroinflammation.* – 2018. – Vol. 15, № 1. – P. 199.
64. Dixon, S.J. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death / S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht et al. // *Cell.* – 2012. – Vol. 149, № 5. – P. 1060-1072.
65. Dozio, E. Advanced Glycation End Products (AGE) and Soluble Forms of AGE Receptor: Emerging Role as Mortality Risk Factors in CKD / E. Dozio, S. Vettoretti, L. Caldiroli et al. // *Biomedicines.* – 2020. – Vol. 8, № 12. – P. 638.
66. Drucker, D.J. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes / D.J. Drucker, M.A. Nauck // *Lancet.* – 2006. – Vol. 368, № 9548. – P. 1696-1705.
67. Du, C. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition / C. Du, M. Fang, Y. Li et al. // *Cell.* – 2000. – Vol. 102, № 1. – P. 33-42.

68. Eiam-Ong, S. Aldosterone rapidly activates p-PKC delta and GPR30 but suppresses p-PKC epsilon protein levels in rat kidney / S. Eiam-Ong, M. Chaipipat, K. Manotham, S. Eiam-Ong // *Endocr Regul.* – 2019. – Vol. 53, № 3. – P. 154-164.
69. Eid, A.A. Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases / A.A. Eid, Y. Gorin, B.M. Fagg // *Diabetes.* – 2009. – Vol. 58, № 5 – P. 1201-1211.
70. El Mokadem, M. A Prospective Single-Blind Randomized Trial of Ramipril, Eplerenone and Their Combination in Type 2 Diabetic Nephropathy / M. El Mokadem, Y. Abd El Hady, A. Aziz A // *Cardiorenal Med.* – 2020. – Vol. 10. – P. 392-401.
71. Epstein, M. Selective Aldosterone Blockade with Eplerenone Reduces Albuminuria in Patients with Type 2 Diabetes / M. Epstein, G.H. Williams, M. Weinberger et al. // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2006. – Vol. 1. – P. 940-951.
72. Erekat, N.S. Programmed cell death in cerebellar Purkinje neurons / N.S. Erekat // *J Integr Neurosci.* – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 30.
73. Fantuzzi, G. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1) / G. Fantuzzi, C.A. Dinarello // *J Clin Immunol.* – 1999. – Vol. 19, № 1. – P. 1-11.
74. Fissell, W.H. What is the glomerular ultrafiltration barrier? / W.H. Fissell, J.H. Miner // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2018. – Vol. 29, № 9. – P. 2262-2264
75. Forbes, J.M. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis / J.M. Forbes, L.T. Yee, V. Thallas et al. // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53, № 7. – P. 1813-1823.
76. Friedmann Angeli, J.P. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice / J.P. Friedmann Angeli, M. Schneider, B. Proneth et al. // *Nat Cell Biol.* – 2014. – Vol. 16, № 12. – P. 1180-1191.
77. Gagliardini, E. Et and diabetic nephropathy: preclinical and clinical studies / E. Gagliardini, C. Zoja, A. Benigni // *Seminars in Nephrology.* – 2015. – Vol. 35, № 2. – P. 188-196.

78. Galli, F. Vitamin E (Alpha-Tocopherol) Metabolism and Nutrition in Chronic Kidney Disease / F. Galli, M. Bonomini, D. Bartolini et al. // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11, № 5. – P. 989.
79. Galluzzi, L. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson et al. // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 486-541.
80. Gheith, O. Diabetic kidney disease: worldwide difference of prevalence and risk factors / O. Gheith, N. Farouk, N. Nampoory et al. // *Journal of Nephro pharmacology*. – 2015. – Vol. 5. – P. 49-56.
81. Ghodsi, R. Carnosine and advanced glycation end products: a systematic review / R. Ghodsi, S. Kheirouri // *Amino Acids*. – 2018. – Vol. 50, № 9. – P. 1177-1186.
82. Giacco, F. Oxidative stress and diabetic complications / F. Giacco, M. Brownlee // *Circ Res.* – 2010. – Vol. 107, № 9. – P. 1058-1070.
83. Goldstein, J.C. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis / J.C. Goldstein, C. Muñoz-Pinedo, J.E. Ricci et al. // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12, № 5. – P. 453-462.
84. Graham, G.G. Clinical pharmacokinetics of metformin / G.G. Graham, J. Punt, M. Arora et al. // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2011. – Vol. 50, № 2. – P. 81-98.
85. Gronda, E. Glucose metabolism in the kidney: Neurohormonal activation and heart failure development / E. Gronda, M. Jessup, M. Jacoviello et al. // *Am. J. Heart Assoc.* – 2020. – Vol. 9, № 23. – P. e018889.
86. Grootjans, S. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview / S. Grootjans, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele // *Cell Death Differ.* – 2017. – Vol. 24, № 7. – P. 1184-1195.
87. Gulevitsch, W.S. Uber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes / W.S. Gulevitsch, S. Amiradzhivi // *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* – 1900. – Vol. 33. – P. 434-443.
88. Gupta, G. Monotherapy of RAAS blockers and mobilization of aldosterone: A mechanistic perspective study in kidney disease / G. Gupta, R. Dahiya, Y. Singh et al. // *Chem Biol Interact.* – 2020. – 317:108975.

89. Hagen, M. Cell cycle re-entry sensitizes podocytes to injury induced death / M. Hagen, E. Pfister, A. Kosel et al. // *Cell Cycle*. – 2016. – Vol. 15, № 14. – P. 1929-1937.
90. Han, S.Y. Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats / S.Y. Han, C.H. Kim, H.S. Kim et al. // *J Am Soc Nephrol*. – 2006. – Vol. 17, № 5. – P. 1362-1372.
91. He, M. MYDGF attenuates podocyte injury and proteinuria by activating Akt/BAD signal pathway in mice with diabetic kidney disease / M. He, Y. Li, L. Wang et al. // *Diabetologia*. – 2020. – Vol. 63, № 9. – P. 1916-1931.
92. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond / C. Hetz // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2012. – Vol. 13, № 2. – P. 89-102.
93. Hodge, J.E. The Amadori Rearrangement under New Conditions and its Significance for Non-enzymatic Browning Reactions² / J.E. Hodge, C.E. Rist // *Nutrients*. – 2010. – Vol. 2. – P. 1247-1265.
94. Hofmann, M.A. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides / M.A. Hofmann, S. Drury, C. Fu et al. // *Cell*. – 1999. – Vol. 97, № 7. – P. 889-901.
95. Huang, Y. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms / Y. Huang, S. Wongamorntham, J. Kasting et al. // *Kidney Int*. – 2006. – Vol. 69, № 1. – P. 105-113.
96. Huang, Y. Functional renin receptors in renal mesangial cells / Y. Huang, W.A. Border, N.A. Noble // *Curr Hypertens Rep*. – 2007. – Vol. 9, № 2. – P. 133-139.
97. Jin, Q. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: role of polyphenols / Q. Jin, T. Liu, Y. Qiao et al. // *Front Immunol*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1185317.
98. Kandarakis, S.A. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases / S.A. Kandarakis, C. Piperi, F. Topouzis et al. // *Prog Retin Eye Res*. – 2014. – Vol. 42. – P. 85-102.

99. Kandhare, A.D. Antioxidant for treatment of diabetic nephropathy: A systematic review and meta-analysis / A.D. Kandhare, A. Mukherjee S.L., Bodhankar // *Chem Biol Interact.* – 2017. – Vol. 278. – P. 212-221.
- 100.Kang, Y.S. Effect of eplerenone, enalapril and their combination treatment on diabetic nephropathy in type II diabetic rats / Y.S. Kang, G.J. Ko, M.H. Lee et al. // *Nephrol Dial Transplant.* – 2009. – Vol. 24, № 1. – P. 73-84.
- 101.Katz, P.M. The role of the kidney and SGLT2 inhibitors in type 2 diabetes // P.M. Katz, L.A. Leiter // *Canadian Journal of Diabetes.* – 2015. – Vol. 39, № Suppl 5. – P. S167-S175.
- 102.Kaufman, R.J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease / R.J. Kaufman // *J Clin Invest.* – 2002. – Vol. 110, № 10. – P. 1389-1398.
- 103.Kim, H. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies / H. Kim, M. Rafiuddin-Shah, H-C. Tu et al. // *Nat Cell Biol.* – 2006. – Vol. 8, № 12. – P. 1348-1358.
- 104.Kim, M.K. Treatment of diabetic kidney disease: current and future targets / M.K. Kim // *The Korean Journal of Internal Medicine.* – 2017. – Vol. 32, № 4. – P. 622-630.
- 105.Kitada, M. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway / M. Kitada, S. Kume, N. Imaizumi, D. Koya // *Diabetes.* – 2011. – Vol. 60. – P. 634-643.
- 106.Kitada, M. Renal protective effects of resveratrol / M. Kitada, D. Koya // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2013. – Vol. 2013. – 568093.
- 107.Klionsky, D.J. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation / D. J. Klionsky, S.D. Emr // *Science.* – 2000. – Vol. 290, № 5497. – P. 1717-1721.
- 108.Kopel, J. Evolving spectrum of diabetic nephropathy / J. Kopel, C. Pena-Hernandez, K. Nugent // *World Journal of Diabetes.* – 2019. – Vol. 10. – P. 269-279.
- 109.Kopp, J.B. Podocytopathies / J.B. Kopp, H.J. Anders, K. Susztak et al. // *Nat. Rev. Dis. Prim.* – 2020. – Vol. 6, № 1. – P. 68.
- 110.Kumar, P.A. Carboxymethyl lysine induces EMT in podocytes through transcription factor ZEB2: Implications for podocyte depletion and proteinuria

in diabetes mellitus / P.A. Kumar, G.I. Welsh, G. Raghu et al. // Arch Biochem Biophys. – 2016. – Vol. 590. – P. 10-19.

111.Kumar Pasupulati, A., Chitra PS, Reddy GB. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy / A. Kumar Pasupulati, P.S. Chitra, G.B. Reddy // Biomol Concepts. – 2016. – Vol. 7, № 5-6. – P. 293-309.

112.Larsson, T. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers / T. Larsson, U. Nisbeth, O. Ljunggren et al. // Kidney International. – 2003. – Vol. 64, № 6. – P. 2272-2279.

113.Lasagni, L. Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders / L. Lasagni, L. Ballerini, M.L. Angelotti ML et al. // Stem Cells. – 2010. – Vol. 28, № 9. – P. 1674-1685.

114.Lasagni, L. Podocyte mitosis - a catastrophe / L. Lasagni, E. Lazzeri, S.J. Shankland et al. // Curr Mol Med. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 13-23.

115.Ledoux, S.P. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA / S.P. Ledoux, S.E. Woodley, N.J. Patton, G.L. Wilson // Diabetes. – 1986. – Vol. 35. – P. 866-872.

116.Lee, C. Inflammasome as a promising therapeutic target for cancer / C. Lee, HTT. Do, J. Her et al. // Life Sci. – 2019. – Vol. 231. – P. 116593.

117.Lei, M. The emerging role of vitamin D and vitamin D receptor in diabetic nephropathy / M. Lei, Z. Liu, J. Guo // BioMed Research International. – 2020. – Vol. 2020. – P. 4137268.

118.Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // Diabetologia. – 2008. – Vol. 51, № 2. – P. 216-226.

119.Li, J.J. Podocyte biology in diabetic nephropathy / J.J. Li, S.J. Kwak, D.S. Jung et al. // Kidney Int Suppl. – 2007. – Vol. 106, № 1. – P. S36-42.

120.Li, P. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade / P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo et al. // *Cell*. – 1997. – Vol. 91, № 4. – P. 479-489.

121.Li, X. Podocyte injury of diabetic nephropathy: Novel mechanism discovery and therapeutic prospects. / X. Li, Y. Zhang, X. Xing et al. // *Biomed Pharmacother*. – 2023. – 168:115670.

122.Li, Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria / Y. Li, Y.S. Kang, C. Dai et al. // *Am J Pathol*. – 2008. – Vol. 172, № 2. – P. 299-308.

123.Lian, M. Long-term Mineralocorticoid Receptor Blockade Ameliorates Progression of Experimental Diabetic Renal Disease / M. Lian, T.D. Hewitson, B. Wigg et al. // *Nephrol. Dial. Transpl*. – 2012. – Vol. 27. – P. 906-912.

124.Liapis, H. New insights into the pathology of podocyte loss: mitotic catastrophe / H. Liapis, P. Romagnani, H-J. Anders // *Am J Pathol*. – 2013. – Vol. 183, № 5. – P. 1364-1374.

125.Lin, J.S. Podocytes: the weakest link in diabetic kidney disease? / J.S. Lin, K. Susztak // *Curr Diab Rep*. – 2016. – Vol. 16, № 5. – P. 45.

126.Liu, B.C. High glucose induces podocyte apoptosis by stimulating TRPC6 via elevation of reactive oxygen species / B.C. Liu, X. Song, X.Y. Lu et al. // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – Vol. 1833, № 6. – P. 1434-1442.

127.Liu, C. Necroptosis: a novel manner of cell death, associated with stroke (Review) / C. Liu, K. Zhang, H. Shen et al. // *Int J Mol Med*. – 2018. – Vol. 41, № 2. – P. 624-630.

128.Liu, G. Involvement of Mineralocorticoid Receptor in High Glucose-Induced Big Mitogen-Activated Protein Kinase 1 Activation and Mesangial Cell Proliferation / G. Liu, K. Miyat, H. Hitomi et al. // *J. Hypertens*. – 2010. – Vol. 28. – P. 536-542.

129.Liu, S. Podocyte injury in diabetic kidney disease: a focus on mitochondrial dysfunction / S. Liu, Y. Yuan, Y. Xue et al. // *Front Cell Dev Biol*. – 2022a. – Vol. 10. – 832887.

- 130.Liu, X-Q. Wogonin protects glomerular podocytes by targeting Bcl-2-mediated autophagy and apoptosis in diabetic kidney disease / X-Q. Liu, L. Jiang, Y-Y. Li et al. // *Acta Pharmacol Sin.* – 2022b. – Vol. 43, № 1. – P. 96-110.
- 131.Loughrey, C.M. Oxidative stress in haemodialysis / C.M. Loughrey, I.S. Young, J.H. Lightbody et al. // *QJM.* – 1994. – Vol. 87, № 11. – P. 679-683.
- 132.Luetscher, J.A. Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications / J.A. Luetscher, F.B. Kraemer, D.M. Wilson et al. // *N Engl J Med.* – 1985. – Vol. 312, № 22. – P. 1412-1417.
- 133.Magee, C. Diabetic Nephropathy: a Tangled Web to Unweave / C. Magee, D.J. Grieve, C.J. Watson, D.P. Brazil // *Cardiovasc Drugs Ther.* – 2017. № (5-6). – P. 579-592.
- 134.Maillard, L. Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way / L. Maillard // *Compt Rend.* – 1912. – Vol. 154. – P. 66-68.
- 135.Makita, Z. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy / Z. Makita, S. Radoff, E.J. Rayfield et al. // *N Engl J Med.* – 1991. – Vol. 325, № 12. – P. 836-842.
- 136.Martínez-Díaz, I. Endothelin Receptor Antagonists in Kidney Disease / I. Martínez-Díaz, N. Martos, C. Llorens-Cebrià et al. // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 4. – P. 3427.
- 137.Mathew, S. Integrins in renal development / S. Mathew, X. Chen, A. Pozzi, R. Zent // *Pediatr Nephrol.* – 2012. – Vol. 27, № 6. – P. 891-900.
- 138.Mentlein, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) – role in the inactivation of regulatory peptides / R. Mentlein // *Regulatory Peptides.* – 1999. – Vol. 85. – P. 9-24.
- 139.Mercure, C. Chronic increases in circulating prorenin are not associated with renal or cardiac pathologies / C. Mercure, G. Prescott, M.J. Lacombe // *Hypertension.* – 2009. – Vol. 53, № 6. – P. 1062-1069.
- 140.Meyer, C. Abnormal renal and hepatic metabolism in type 2 diabetes / C. Meyer, M. Stumvoll, V. Nadkarni et al. // *J. Clin. Investig.* – 1998. – Vol. 102, № 3. – P. 619-624.

141. Mezzano, S.A. Angiotensin II and renal fibrosis / S.A. Mezzano, M. Ruiz-Ortega, J. Egido // *Hypertension*. – 2001. – Vol. 38, № 3 Pt 2. – P. 635-638.
142. Miao, E.A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria / E.A. Miao, I.A. Leaf, P.M. Treuting et al. // *Nat Immunol*. – 2010. – Vol. 11, № 12. – P. 1136-1142.
143. Miceli, V. Carnosine protects pancreatic beta cells and islets against oxidative stress damage / V. Miceli, M. Pampalone, G. Frazziano et al. // *Mol Cell Endocrinol*. – 2018. – Vol. 474. – P. 105-118.
144. Mihailidou, A.S. Non-Genomic Effects of Aldosterone / A.S. Mihailidou, A.G. Tzakos, A.W. Ashton // *Vitam Horm*. – 2019. – 109:133-149.
145. Miyata, K. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells / K. Miyata, M. Rahman, T. Shokoji et al. // *J Am Soc Nephrol*. – 2005. – Vol. 16, № 10. – P. 2906-2912.
146. Miyata, T. Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine, an advanced glycation end product: carbonyl stress in uremia / T. Miyata, Y. Ueda, Y. Yamada et al. // *J Am Soc Nephrol*. – 1998. – Vol. 9, № 12. – P. 2349-2356.
147. Miyazawa, T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions / T. Miyazawa, G.C. Burdeos, M. Itaya et al. // *IUBMB Life*. – 2019. – Vol. 71, № 4. – P. 430-441.
148. Mohandes, S. Molecular pathways that drive diabetic kidney disease / S. Mohandes, T. Doke, H. Hu, D. Mukhi, P. Dhillon, K. Susztak // *J Clin Invest*. – 2023. – Vol. , № 4. – P. e165654.
149. Monnier, V.M. Structure of advanced Maillard reaction products and their pathological role / V.M. Monnier, R.H. Nagaraj, M. Portero-Otin et al. // *Nephrol Dial Transplant*. – 1996. – Vol. 11, № 5. – P. 20-26.
150. Moreno, J.A. A slit in podocyte death / J.A. Moreno, M.D., Sanchez-Niño, A.B. Sanz et al. // *Curr Med Chem*. – 2008. – Vol. 15, № 16. – P. 1645-1654.
151. Murata, M. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin / M. Murata, A. Takahashi, I. Saito, S. Kawanishi // *Biochem Pharmacol*. – 1999. – Vol. 57. – P. 881-887.

152.Nagai, R. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications / R. Nagai, D.B. Murray, T.O. Metz, J.W. Baynes // *Diabetes*. – 2012. – Vol. 61. – P. 549–559.

153.Nagata, M. Podocyte injury and its consequences / M. Nagata // *Kidney Int.* – 2016. – Vol. 89, № 6. – P. 1221-1230.

154.Namiki, M. Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens / M. Namiki // *Adv Food Res.* – 1988. – Vol. 32. – P. 115-184.

155.Nasim, N. Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects / N. Nasim, I.S. Sandeep, S. Mohanty // *Nucleus (Calcutta)*. – 2022. – Vol. 65, № 3. – P. 399-411.

156.Neumiller, J.J. Therapeutic considerations for antihyperglycemic agents in diabetic kidney disease/ J.J. Neumiller, R.Z. Alicic, K.R. Tuttle // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2017. – Vol. 28, № 8. – P. 2263-2274.

157.Nguyen, G. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen / G. Nguyen, F. Delarue, J. Berrou, E. Rondeau, J.D. Sraer // *Kidney Int.* – 1996. – Vol. 50, № 6. – P. 1897-1903.

158.Nguyen, G. The biology of the (pro)renin receptor /G. Nguyen, D.N. Muller // *J Am Soc Nephrol*. – 2010. – Vol. 21, № 1. – P. 18-23.

159.Nishikawa, T. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage / T. Nishikawa, D. Edelstein, X.L. Du et al. // *Nature*. – 2000. – Vol. 404, № 6779. – P. 787-790.

160.Ogurtsova, K. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 / K. Ogurtsova, J.D. da Rocha Fernandes, Y. Huang et al. // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2017. – Vol. 128. – P. 40-50.

161.Palmer, K.J. Gliclazide. An update of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in non-insulin-dependent diabetes mellitus / K.J. Palmer, R.N. Brogden // *Drugs*. – 1993. – Vol. 46. – P. 92-125.

162.Panchapakesan, U. The role of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in diabetic kidney disease / U. Panchapakesan, C. Pollock // *Frontiers in Immunology*. – 2015. Vol. 6. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00443>, 2-s2.0-84941272190.

163.Parzych, K.R. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation / K.R. Parzych, D.J. Klionsky // *Antioxid Redox Signal*. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 460-473.

164.Pavenstädt, H. Cell biology of the glomerular podocyte / H. Pavenstädt, W. Kriz, M. Kretzler // *Physiol Rev*. – 2003. – Vol. 83, № 1. – P. 253-307.

165.Pérez-Morales, R.E. Inflammation in diabetic kidney disease / R.E. Pérez-Morales, M.D. del Pino, J.M. Valdivielso et al. // *Nephron*. – 2019. – Vol. 143, № 1. – P. 12-16.

166.Pergola, P.E. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes / P.E. Pergola, P. Raskin, R.D. Toto et al // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 365, № 4. – P. 327-336.

167.Peters, B. Dose-dependent titration of prorenin and blood pressure in Cyp11a1ren-2 transgenic rats: absence of prorenin-induced glomerulosclerosis / B. Peters, O. Grisk, B. Becher et al. // *J Hypertens*. – 2008. – Vol. 26, № 1. – P. 102-109.

168.Pieper, A.A. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death / A.A. Pieper, A. Verma, J. Zhang, S.H. Snyder // *Trends Pharmacol Sci*. – 1999. – Vol. 20. – P.: 171-181.

169.Piperi, C. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases / C. Piperi, C. Adamopoulos, G. Dalagiorgou et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2012. – Vol. 97, № 7. – P. 2231-2242.

170.Piwkowska, A. High glucose concentration affects the oxidantantioxidant balance in cultured mouse podocytes / A. Piwkowska, D. Rogacka, I. Audzeyenka et al. // *J. Cell. Biochem*. – 2011. – Vol. 112, № 6. – P. 1661-1672.

171.Piwkowska, A. Hydrogen peroxide induces dimerization of protein kinase G type I α subunits and increases albumin permeability in cultured rat podocytes / A. Piwkowska, D. Rogacka, M. Jankowski et al. // *J. Cell. Physiol*. – 2012. – Vol. 227, № 3. – P. 1004-1016.

172. Piwkowska, A. High glucose increases glomerular filtration barrier permeability by activating protein kinase G type I α subunits in a Nox4-dependent manner / A. Piwkowska, D. Rogacka, D., I. Audzeyenka et al. // *Experimental Cell Research*. – 2014. – Vol. 320, № 1. – P. 144-152.

173. Pugliese, G. Diabetic kidney disease: new clinical and therapeutic issues. Joint position statement of the Italian Diabetes Society and the Italian Society of Nephrology on “The natural history of diabetic kidney disease and treatment of hyperglycemia in patients with type 2 diabetes and impaired renal function” / G. Pugliese, P. Penno, A. Natali // *Journal of Nephrology*. – 2020. – Vol. 33. – P. 9-35.

174. Putt, D.A. Adaptive changes in renal mitochondrial redox status in diabetic nephropathy / D.A. Putt, Q. Zhong, L.H. Lash // *Toxicol Appl Pharmacol*. – 2012. – Vol. 258, N 2. – P. 188-198.

175. Qiao, Y. Resveratrol ameliorates diabetic nephropathy in rats through negative regulation of the p38 MAPK/TGF- β 1 pathway / Y. Qiao, K. Gao, Y. Wang et al. // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2017. – Vol. 13. – P. 3223-3230.

176. Rakieten, N. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917) / N. Rakieten, M.L. Rakieten, M.V. Nadkarni // *Cancer Chemother Rep*. – 1963. – Vol. 29. – P. 91-98.

177. Rask-Madsen, C. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors / C. Rask-Madsen, G.L. King // *Cell Metab*. – 2013. – Vol. 17, № 1. – P. 20-33.

178. Ratnam, D.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective / D.V. Ratnam, D.D. Ankola, V. Bhardwaj et al. // *Control Release*. – 2006. – Vol. 113, № 3. – P. 189-207.

179. Ronco, P. Proteinuria: is it all in the foot? / P. Ronco // *J Clin Invest*. – 2007. – Vol. 117. – P. 2079-2082.

180. Ruiz, S. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease / S. Ruiz, P.E. Pergola, R.A. Zager, N.D. Vaziri // *Kidney International*. – 2013. – Vol. 83. – P. 1029-1041.

181.Saklayen, M.G. Effects of additive therapy with spironolactone on proteinuria in diabetic patients already on ACE inhibitor or ARB therapy: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover trial / M.G. Saklayen, L.K. Gyebi, J. Tasosa, J. Yap // *Journal of Investigative Medicine*. – 2008. – Vol. 56. – P. 714-719.

182.Sakoda, M. (Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells / M. Sakoda, A. Ichihara, Y. Kaneshiro et al. // *Hypertens Res*. – 2007. – Vol. 30, № 11. – P. 1139-1146.

183.Salami, M. Therapeutic Potential of Resveratrol in Diabetic Nephropathy According to Molecular Signaling / M. Salami, R. Salami, A. Mafi et al. // *Curr Mol Pharmacol*. – 2022. – Vol. 15, № 5. – P. 716-735.

184.Samsu, N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. / N. Samsu // *Biomed Res Int*. – 2021. – Vol. 8; 2021:1497449.

185.Sapian, S. Role of Polyphenol in Regulating Oxidative Stress, Inflammation, Fibrosis, and Apoptosis in Diabetic Nephropathy / S. Sapian, S.B. Budin, I.S. Taib et al. // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. – 2022. – Vol. 22, № 5. – P. 453-470.

186.Schein, P.S. The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity / P.S. Schein, D.A. Cooney, M.L. Vernon // *Cancer Res*. – 1967. – Vol. 27. – P. 2324-2332.

187.Schein, P.S. Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin (NSC-85998) / P.S. Schein, M.J. O'Connell, J. Blom et al. // *Cancer*. – 1974. – Vol. 34. – P. 993-1000.

188.Schiffer, M. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7 /M. Schiffer, M. Bitzer, I.S. Roberts et al. // *J Clin Invest*. – 2001. – Vol. 108, № 6. – P. 807-816.

189.Śędzikowska, A. Human Glucose Transporters in Renal Glucose Homeostasis / A. Śędzikowska, L. Szablewski // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22, № 24. – P. 13522.

190.Sepasi Tehrani, H. Catalase and its mysteries / H. Sepasi Tehrani, A.A. Moosavi-Movahedi // *Prog Biophys Mol Biol*. – 2018. – Vol. 140. – P. 5-12.

191. Sever, S. Actin dynamics at focal adhesions: a common endpoint and putative therapeutic target for proteinuric kidney diseases / S. Sever, M. Schiffer // *Kidney Int.* – 2018. – Vol. 93, № 6. – P. 1298-1307.
192. Shankland, S.J. Podocyte aging: why and how getting old matters / S.J. Shankland, Y. Wang, A.S. Shaw et al. // *J Am Soc Nephrol.* – 2021. – Vol. 32, № 11. – P. 2697-2713.
193. Shibata, S. Fluvastatin Ameliorates Podocyte Injury in Proteinuric Rats via Modulation of Excessive Rho Signaling / S. Shibata, M. Nagase, T. Fujita // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2006. – Vol. 17. – P. 754-764.
194. Shibata, S. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1 / S. Shibata, M. Nagase, S. Yoshida et al. // *Hypertension.* – 2007. – Vol. 49, № 2. – P. 355-364.
195. Silbiger, S. Nonenzymatic glycation of mesangial matrix and prolonged exposure of mesangial matrix to elevated glucose reduces collagen synthesis and proteoglycan charge / S. Silbiger, S. Crowley, Z. Shan et al. // *Kidney Int.* – 1993. – Vol. 43, № 4. – P. 853-864.
196. Singh, R. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation / R. Singh, N. Alavi, A.K. Singh, D.J. Leehey // *Diabetes.* – 1999. – Vol. 48, № 10. – P. 2066-2073.
197. Sosna, J. The proteases HtrA2/Omi and UCH-L1 regulate TNF-induced necroptosis / J. Sosna, S. Voigt, S. Mathieu et al. // *Cell Commun Signal.* – 2013. – Vol. 11. – P. 76.
198. Striker, L.J. Administration of AGEs in vivo induces extracellular matrix gene expression / Striker, L.J., Striker GE. // *Nephrol Dial Transplant.* – 1996. – Vol. 11, № 5. – P. 62-65.
199. Susztak, K. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy / K. Susztak, A.C. Raff, M. Schiffer, E.P. Böttinger // *Diabetes.* – 2006. – Vol. 55, № 1. – P. 225-233.

200.Szwergold, B.S. Carnosine and anserine act as effective transglycating agents in decomposition of aldose-derived Schiff bases / B.S. Szwergold // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – Vol. 336. – P. 36–41.

201.Takeda, T. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells / T. Takeda, W.Y. Go, R.A. Orlando, M.G. // *Mol Biol Cell.* – 2000. – Vol. 11, № 9. – P. 3219-3232.

202.Tan, S.M. Combating oxidative stress in diabetic complications with Nrf2 activators: how much is too much? / S.M. Tan, J.B. de Haan // *Redox Report.* – 2014. – Vol. 19. – P. 107-117.

203.Tang, D. The molecular machinery of regulated cell death / D. Tang, R. Kang, T.V. Berghe et al. // *Cell Res.* – 2019. – Vol. 29, № 5. – P. 347-364.

204.Teh, Y.M. A comprehensive insight into autophagy and its potential signaling pathways as a therapeutic target in podocyte injury / Y.M. Teh, S.A. Mualif, S.K. Lim // *Int J. Biochem Cell Biol.* – 2022. – Vol. 143. – Article 106153.

205.Tiruppathi, C. Hydrolysis and transport of proline-containing peptides in renal brush-border membrane vesicles from dipeptidyl peptidase IV-positive and dipeptidyl peptidase IV-negative rat strains / C Tiruppathi, Y. Miyamoto, V. Ganapathy et al. // *Journal of Biological Chemistry.* – 1990. – Vol. 265. – P. 1476-1483.

206.Tsilibary, E.C. The effect of nonenzymatic glycosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen / E.C. Tsilibary, A.S. Charonis, L.A. Reger et al. // *J Biol Chem.* – 1988. – Vol. 263, № 9. – P. 4302-4308.

207.Tucker, J.M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease / J.M. Tucker, D.M. Townsend // *Biomed Pharmacother.* – 2005. – Vol. 59, № 7. – P. 380-387.

208.Tummers, B. Caspase-8: regulating life and death / B. Tummers, D.R. Green // *Immunol Rev.* – 2017. – Vol. 277, № 1. – P. 76-89.

209.Uchigata, Y. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis / Y. Uchigata, H. Yamamoto, A. Kawamura, H. Okamoto // *J Biol Chem.* – 1982. – Vol. 257. – P. 6084-6088.

- 210.Umanath, K. Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018 / K. Umanath, J.B. Lewis // *Am. J. Kidney Dis.* – 2018. – Vol. 71, № 6. P. 884-895.
- 211.Valencia, W.M. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control / W.M. Valencia, H. Florez // *BMJ.* – 2017. – Vol. 356. – Article i6505.
- 212.Vallon, V. SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice / V. Vallon, M. Gerasimova, M.A. Rose et al. // *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* – 2014. – Vol. 306, № 2. – P. F194-F204.
- 213.Vallon, V. Glucose transporters in the kidney in health and disease / V. Vallon // *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* – 2020. – Vol. 472. – P. 1345-1370.
- 214.Vitale, I. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability / I. Vitale, L. Galluzzi, M. Castedo, G. Kroemer // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12, № 6. – P. 385-392.
- 215.Vlassara, H. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats / H. Vlassara, L.J. Striker, S. Teichberg et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1994. – Vol. 91, № 24. – P. 11704-11708.
- 216.Wang, H. Emerging role of ferroptosis in diabetic kidney disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities / H. Wang, D. Liu, B. Zheng et al. // *Int J Biol Sci.* – 2023. – Vol. 19, № 9. – P. 2678-2694.
- 217.Wang, M-Z. Fucoidan alleviates renal fibrosis in diabetic kidney disease via inhibition of NLRP3 inflammasome-mediated podocyte pyroptosis / M-Z. Wang, J. Wang, D-W. Cao et al. // *Front Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – 790937.
- 218.Wang, X. Paeoniflorin directly binds to TNFR1 to regulate podocyte necroptosis in diabetic kidney disease / X. Wang, X-Q. Liu, L. Jiang et al. // *Front Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – 966645.
- 219.Wang, Y. Vitamin D receptor signaling in podocytes protects against diabetic nephropathy / Y. Wang, D.K. Deb, Z. Zhang et al. // *Journal of the American Society of Nephrology.* – 2012. – Vol. 23, № 12. – P. 1977-1986.

220.Wang, Z. Inhibition of the lncRNA MIAT prevents podocyte injury and mitotic catastrophe in diabetic nephropathy / Z. Wang, Y. Chang, Y. Liu et al. // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2022. – Vol. 28. – P. 136-153.

221.Wanner, C. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes / C. Wanner, S.E. Inzucchi, J.M. Lachin et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 375, № 4. – P. 323-334.

222.Wautier, M.P. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE / M. P. Wautier, O. Chappey, S. Corda et al. // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2001. – Vol. 280, № 5. – P. E685-694.

223.Weinberger, M.H. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Mild-To-Moderate Hypertension / M.H. Weinberger, B. Roniker, S.L. Krause, R.J. Weiss // *Am. J. Hypertens*. – 2002. – Vol. 15. – P. 709-716.

224.Wennmann, D.O. The renin-angiotensin-aldosterone system in podocytes / D.O. Wennmann, H.-H. Hsu, H. Pavenstädt // *Seminars in Nephrology*. – 2012. – Vol. 32, № 4. – P. 377-384.

225.White, F.R. Streptozotocin / F.R. White // *Cancer Chemother Rep*. – 1963. – Vol. 30. – P. 49-53.

226.Wilson, G.L. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution / G.L. Wilson, P.C. Hartig, N.J. Patton, S.P. LeDoux // *Diabetes*. – 1988. – Vol. 37. – P. 213-216.

227.Witko-Sarsat, V. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia / V. Witko-Sarsat, M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin et al. // *Kidney Int*. – 1996. – Vol. 49, № 5. – P. 1304-1313.

228.Wolf, G. Cellular and Molecular Mechanisms of Proteinuria in Diabetic Nephropathy / G. Wolf, F.N. Ziyadeh // *Nephron Physiology*. – 2007. – Vol. 106, № 2. – P. p26-p31.

229.Wolff, S.P. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes / S.P. Wolff, R.T. Dean // *Biochem J*. – 1987. – Vol. 245, № 1. – P. 243-250.

230.Xiong, D. Rhein Inhibited Ferroptosis and EMT to Attenuate Diabetic Nephropathy by Regulating the Rac1/NOX1/ β -Catenin Axis / D. Xiong, W. Hu, X. Han, Y. Cai // *Front Biosci (landmark Ed)*. – 2023. – Vol. 28, № 5. – P. 100.

231.Xu, Y. High glucose-induced apoptosis and necroptosis in podocytes is regulated by UCHL1 via RIPK1/RIPK3 pathway/ Y. Xu, H. Gao, Y. Hu et al. // *Exp Cell Res*. – 2019. – Vol. 382, № 2. – 111463.

232.Xue, R. Mechanistic insight and management of diabetic nephropathy: recent progress and future perspective / R. Xue, D. Gui, L. Zheng et al. // *Journal of Diabetes Research*. – 2017. – 2017:7.

233.Yacoub, R. Inhibition of RAS in diabetic nephropathy / R. Yacoub, K.N. Campbell // *Int J Nephrol Renovasc Dis*. – 2015. – Vol. 8. – P. 29-40.

234.Yamagishi, S. Serum or cerebrospinal fluid levels of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs) may be a promising biomarker for early detection of Alzheimer's disease / S. Yamagishi, K. Nakamura, H. Inoue et al. // *Med Hypotheses*. – 2005. – Vol. 64, № 6. – P. 1205-1207.

235.Yamagishi, S. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy / S. Yamagishi, T. Matsui // *Oxid Med Cell Longev*. – 2010. – Vol. 3, № 2. – P. 101-108.

236.Yamamoto, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets / H. Yamamoto, Y. Uchigata, H. Okamoto // *Nature*. – 1981. – Vol. 294. – P. 284-286.

237.Yamamoto, Y. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice / Y. Yamamoto, I. Kato, T. Doi et al. // *J Clin Invest*. – 2001. – Vol. 108, № 2. – P. 261-268.

238.Yamamoto, Y. Receptor for advanced glycation end products is a promising target of diabetic nephropathy / Y. Yamamoto, T. Doi, I. Kato et al. // *Ann N Y Acad Sci*. – 2005. – Vol. 1043. – P. 562-566.

239.Yang, C. Research progress on multiple cell death pathways of podocytes in diabetic kidney disease / C. Yang, Z. Zhang, J. Liu et al. // *Mol Med*. – 2023. – Vol. 29, № 1. – P. 135.

240. Yang, C.W. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease / C.W. Yang, H. Vlassara, E.P. Peten et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1994. – Vol. 91, № 20. – P. 9436-9440.

241. Yang, W.S. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells / W.S. Yang, B.R. Stockwell // *Chem Biol.* – 2008. – Vol. 15, № 3. – P. 234-245.

242. Yoshida, G.J. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: from pathophysiology to treatment / G.J. Yoshida // *J Hematol Oncol.* – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 67.

243. Youle, R.J. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. / R.J. Youle, A. Strasser // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 47-59.

244. Yu, Z. Necroptosis: a novel pathway in neuroinflammation / Z. Yu, N. Jiang, W. Su, Y. Zhuo // *Front Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – 701564.

245. Yue, J. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis / J. Yue, J.M. López // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 7. – P. 2346.

246. Zac-Varghese, S. Managing diabetic kidney disease / S. Zac-Varghese, P. Winocour // *British Medical Bulletin.* – 2018. – Vol. 125. – P. 55-66.

247. Zhan, P. Myeloid-derived growth factor deficiency exacerbates mitotic catastrophe of podocytes in glomerular disease / P. Zhan, Y. Zhang, W. Shi et al. // *Kidney Int.* – 2022. – Vol. 102, № 3. – P. 546-559.

248. Zhang, L. Trends in chronic kidney disease in China / L. Zhang, J. Long, W. Jiang et al. // *New England Journal of Medicine.* – 2016. – Vol. 375. – P. 905-906.

249. Zhang, Y. Plasma membrane changes during programmed cell deaths / Y. Zhang, X. Chen, C. Gueydan, J. Han // *Cell Res.* – 2018. – Vol. 28, № 1. – P. 9-21.

250. Zhao, C. “Multiomics” analyses combined with systems pharmacology reveal the renoprotection of mangiferin monosodium salt in rats with diabetic nephropathy: focus on improvements in renal ferroptosis, renal inflammation, and podocyte insulin resistance / C. Zhao, Z. Pu, J. Gao et al. // *J Agric Food Chem.* – 2023. – Vol. 71, № 1 – P. 358-381.

251. Zhaolin, Z. Role of pyroptosis in cardiovascular disease / Z. Zhaolin, L. Guohua, W. Shiyuan, W. Zuo // *Cell Prolif.* – 2019. – Vol. 52, № 2. – P. e12563.

252.Zhong, J. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease / J. Zhong, X. Rao, S. Rajagopalan // *Atherosclerosis*. – 2013. – Vol. 226. P. – 305-314.

253.Zhong, O. Antioxidant for treatment of diabetic complications: A meta-analysis and systematic review / O. Zhong, J. Hu, J. Wang et al. // *J Biochem Mol Toxicol*. – 2022. – Vol. 36, № 6. – P. e23038.

254.Zhou, B. Worldwide trends in diabetes since 1980 a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants / B. Zhou, Y. Lu, K. Hajifathalian // *Lancet*. – 2016. – Vol. 387, № 10027. – P. 1513-1530.

255.Zhu, Y.T. Mitochondrial Oxidative Stress and Cell Death in Podocytopathies / Y.T. Zhu, C. Wan, J.H. Lin et al. // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12, № 3. – P. 403.

256.Zimpelmann, J. Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat / J. Zimpelmann, D. Kumar, D.Z. Levine et al. // *Kidney Int*. – 2000. – Vol. 58, № 6. – P. 2320-2330.

257.Ziyadeh, F.N. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice / F.N. Ziyadeh, B.B. Hoffman, D.C. Han et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2000. – Vol. 97, № 14. – P. 8015-8020.