

© М.М.Батюшин, Д.Г.Пасечник, Д.С.Бобылев, А.У.Уруджев, 2015
УДК 616.61-036.12:57.017.35

М.М. Батюшин¹, Д.Г. Пасечник², Д.С. Бобылев¹, А.У. Уруджев¹

ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАК ОДИН ИЗ АСПЕКТОВ РЕПАРАЦИИ ПОЧЕК В РАМКАХ ХРОНИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ

¹Кафедра внутренних болезней с основами общей физиотерапии №2; ²Центральная научно-исследовательская лаборатория Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону, Россия

M.M. Batiushin¹, D.G. Pasechnik², D.S. Bobilev¹, A.U. Urudjev¹

EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AS AN ASPECT OF KIDNEY REPARATION IN CONTEXTE OF CHRONIC NEPHROPATHY

¹Department of internal disease with fundamentals of physical therapy №2; ²Central Research Laboratory Rostov State Medical University, Russia

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ: оценить взаимосвязь эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) с повреждением паренхимы и нарушением функции почек. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** В исследование было включено 62 пациента с различными формами хронического гломерулонефрита (ГН), 25 мужчин и 37 женщин. Для оценки эпителиального фенотипа клеток использовались моноклональные антитела (фирма «ДАКО», ready-to-use (RTU) к панцитокератину (клон AE1/AE3), E-кадгерину (клон NCH-38), CD10 (клон 56C6), в качестве маркеров мезенхимальной дифференцировки использовались моноклональные антитела к виментину (клон V9) и альфа-гладкомышечному актину (клон 1A4). Оценка пролиферативной активности тубулярного эпителия проводилась с помощью антител к Ki67 (клон MIB-1). **РЕЗУЛЬТАТЫ.** По результатам исследования ЭМТ наблюдалась у 66% пациентов, у 34% данного явления не обнаружено. Тубулоинтерстициальный фиброз (ТИФ) имел умеренную выраженность в 84%, в 11% случаев был выраженным, у 5% пациентов не отмечался. В группе больных с IgA-нефропатией и ФСГС при проведении регрессионного логистического анализа при отсутствии ЭМТ риск развития тПН составил 8%, при умеренно выраженном ЭМТ риск тПН увеличился до 55% (df= 1, p=0,003). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, согласно результатам проведенного исследования, в группе больных с ЭМТ достоверно чаще встречаются более тяжелые стадии ХБП.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, эпителиально-мезенхимальная трансформация, тубулоинтерстициальный фиброз, хроническая болезнь почек.

ABSTRACT

AIM: to identify relationship between epithelial-mesenchymal transition (EMT) and renal parenchyma injury and renal dysfunction. **PATIENTS AND METHODS.** The study included 62 patients with various forms of chronic glomerulonephritis (GN), 25 males and 37 females. To assess phenotype of epithelial cells used monoclonal antibodies (company DAKO, ready-to-use (RTU) to pancytokeratine (clone AE1 / AE3), E-cadherin (clone NCH-38), CD10 (clone 56C6), as marker for mesenchymal differentiation used monoclonal antibodies to vimentin (clone V9) and alpha-smooth muscle actin (clone 1A4). Evaluation of tubular epithelium proliferative activity was performed using antibodies to Ki67 (clone MIB-1). **RESULTS.** According to the study EMT was observed in 66% patients, in 34% this phenomenon is not found. Tubulointerstitial fibrosis (TIF) had moderate severity in 84%, in 11% cases was significant, in 5% of patients not found. In patients group with IgA-nephropathy and FSGS, during logistic regression analysis without EMT risk of ESRF was 8%, with moderate EMT end-stage renal failure risk increased to 55% (df = 1, p = 0,003). **CONCLUSIONS.** Thus, according to results of the study, in patients with EMT severe CKD stages are significantly more common.

Key words: chronic glomerulonephritis, epithelial-mesenchymal transition, tubulointerstitial fibrosis, chronic kidney disease.

ВВЕДЕНИЕ

Одними из основных факторов риска прогрессирования почечного фиброза, независимо от этиологии заболевания, являются протеинурия и окислительный стресс. До недавнего времени полагали,

что гломерулярные и тубулоинтерстициальные процессы фиброза обусловлены взаимодействием между проникающими в ткань воспалительными и резидентными почечными клетками, приводящими к замене паренхимы внеклеточным коллагеновым матриксом. В настоящее время установлены новые аспекты повреждения почек – доказана способность гломерулярных и канальцевых клеток к

Батюшин М.М. 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29. Ростовский государственный медицинский университет, кафедра внутренних болезней с основами физиотерапии №2. Тел.: +7 918-501-88-01, E-mail: batjushin-m@rambler.ru

фенотипическим изменениям в процессе ремоделирования. В ответ на повреждение гломерулярные и канальцевые эпителиоциты регрессируют до примитивно-зародышевого мезенхимального фенотипа путем эпителиально-мезенхимальной трансформации. Пластичность клеток эпителия обусловлена, главным образом, двумя процессами: метаплазией, или трансдифференциацией, и эпителиально-мезенхимальной трансформацией (ЭМТ), или клеточной трансформацией. В обоих случаях происходит активация «запрещенных к экспрессии» генов локусов хромосом. При ЭМТ генетический материал «рекрутируется» по нескольким направлениям.

Первый тип ЭМТ характерен для эмбриональных тканей, в стадию гастрюляции и образования нервной трубки. Для него важно образование из первичного эпителия кластера мезенхимальных клеток с последующим образованием вторичного эпителия.

Второй тип ЭМТ реализуется при персистирующем повреждении клеток. Схема событий такова: при раздражении мембраны эпителиоцитов происходит нарастание стресс-волокон, «рекрутирование» молекулярных носителей ЭМТ, синтез сократительных волокон, накопление в клетках лизосом, лизис подлежащей базальной мембраны с последующим формированием псевдоподий на мембране клеток и выходом в окружающую межклеточную ткань с началом функционирования данных клеток как фибробласты. Важно отметить один момент: неизвестно, есть ли в этом процессе «промежуточная» мезенхимальная, малодифференцированная стадия, или же эпителиоциты сразу превращаются в «зрелые» фибробласты [1–3].

Третий тип ЭМТ реализуется в опухолях (карциномах). У опухолевых клеток появляется возможность передвигаться и метастазировать с током крови [4].

Отличием же метаплазии от ЭМТ служит то, что при метаплазии из эпителия образуется вновь эпителий, хоть и другого типа, при ЭМТ происходит качественный скачок в пользу «открытия» новых, ранее не используемых, но предсуществующих «запрещенных» генов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 62 пациента, средний возраст $37,8 \pm 1,9$ года, с различными формами хронического гломерулонефрита и другими нефропатиями, из них 25 мужчин и 37 женщин. По результатам нефробиопсий в группе обследуемых наблюдали следующие формы нефропатий: IgA-

нефропатия – 22 человека; фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) – 9 человек; болезнь минимальных изменений – 5 человек; амилоидная нефропатия – 5 человек; болезнь тонких мембран – 2 человека; мембранозная нефропатия – 2 человека; С3-нефропатия – 2 человека; быстро прогрессирующий олигоиммунный гломерулонефрит с формированием полулуний – 2 человека, по 1 больному ANCA-ассоциированный очаговый некротическим гломерулонефрит с формирующимися полулуниями – 1 человек; быстро прогрессирующий гломерулонефрит (БПГН) с полулуниями – 1 человек; олигоиммунный гломерулонефрит – 1 человек; сосудистый нефросклероз – 1 человек; мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит 3-го типа – 1 человек; диабетическая нефропатия – 1 человек; люпус-нефрит, мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит 1-го типа – 1 человек; С3-ассоциированный БПГН – 1 человек; иммуноотоксическая нефропатия – 1 человек; криоглобулинемический гломерулонефрит – 1 человек.

Средний уровень креатинина в сыворотке крови в группе составил $200,2 \pm 29,4$ мкмоль/л, средний уровень протеинурии – $2,2 \pm 0,25$ г/л, средняя продолжительность нефропатии – $2,5 \pm 0,7$ года, систолическое АД – $140,6 \pm 1,9$ мм рт. ст., диастолическое АД – $90,6 \pm 0,9$ мм рт. ст., средний уровень скорости клубочковой фильтрации (СКФ), рассчитанный по формуле СКД-ЕРІ, – $62,6 \pm 4,8$ мл/мин/1,73 м², по четырехкомпонентной формуле MDRD – $45,4 \pm 2,4$ мл/мин/1,73 м².

Нефритический синдром наблюдался у 32% пациентов, нефротический синдром без артериальной гипертензии – у 27%, нефротический синдром с артериальной гипертензией – у 12%, изолированный мочевого синдром – у 16%, острое повреждение почек (ОПП) диагностировано у 5%.

Тканевой материал почечных биоптатов для световой микроскопии и иммуногистохимического исследования фиксировали 4% забуференным нейтральным формалином и заключали в парафин по классической методике. Для оценки эпителиального фенотипа клеток использовали моноклональные антитела (фирма «ДАКО», ready-to-use (RTU) к панцитокератину (клон АЕ1/АЕ3), Е-кадгерину (клон NCH-38), CD-10 (клон 56С6), в качестве маркеров мезенхимальной дифференцировки использовали моноклональные антитела к виментину (клон V9) и альфа-гладкомышечному актину (клон 1А4). Оценку пролиферативной активности тубулярного эпителия проводили с помощью антител к Ki67 (клон МІВ-1). Эндотелий выявляли с помощью антител к CD34 класс II

(клон QBEnd 10). ЭМТ оценивали по характеру распространенности (очаговый и распространенный) [5].

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных статистических программ программного обеспечения Statistica 8,0 («StatSoft Inc», USA). Рассчитывали среднюю арифметическую, удельный вес выбранных параметров и их ошибки. При нормальном распределении показателя вычисляли t-критерий Стьюдента, при несимметричном – χ^2 -критерий. Проводили регрессионный анализ с помощью логит-преобразования с использованием теста Cox–Mantel. Проводили анализ выживаемости по Каплану–Майеру по общепринятой методике. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий и связей отвергали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам исследования ЭМТ наблюдалась у 66% пациентов (у 1,5% – распространенная форма), у 34% – данного явления не обнаружено. Тубулоинтерстициальный фиброз имел умеренную выраженность у 84%, в 11% случаев был выраженным, у 5% пациентов не отмечался.

В морфологическом плане все больные были разделены на две группы по наличию ЭМТ и выраженности фиброзирования паренхимы почек.

В группу больных без ЭМТ включили 21 пациента (34%). Средние показатели в этой группе составили: креатинин сыворотки крови – 121 ± 15 мкмоль/л, протеинурия – $1,7 \pm 0,37$ г/л, продолжительность нефропатии – $0,88 \pm 0,05$ лет, возраст – $35,3 \pm 3$ года, СКФ по СКD-EPI – $78,1 \pm 7,6$ мл/мин/1,73 м².

В группу пациентов с умеренно выраженными признаками ЭМТ были включены 41 человек (66%). Средние показатели в этой группе составили: креатинин сыворотки крови – 236 ± 43 мкмоль/л, протеинурия – $2,5 \pm 0,33$ г/л, продолжительность нефропатии – $3,45 \pm 1$ лет, возраст – $39 \pm 2,41$ лет, СКФ по СКD-EPI – $55,67 \pm 5,8$ мл/мин/1,73 м².

В группе больных с умеренно выраженными признаками ЭМТ уровень креатинина был практически вдвое выше, а СКФ достоверно ниже, чем в группе больных без ЭМТ; также отмечались более высокие показатели протеинурии и большая продолжительность нефропатии. При этом возраст пациентов был примерно одинаковым ($39 \pm 2,41$ года и $35,3 \pm 3$ года соответственно, $p > 0,1$), что позволило исключить возрастные процессы из факторов влияния на риск развития ЭМТ

В нашем исследовании частота IgA-нефропатии

составила 35%. В этой когорте больные с ЭМТ составили 63,6%. Наличие умеренно выраженного тубулоинтерстициального фиброза у данной группы составило 77,3%, выраженного – 27,3%. В этой группе полностью отсутствовали пациенты без признаков тубулоинтерстициального фиброза.

ФСГС встречался в 14,5% всех случаев нефропатий. Пациенты с ЭМТ составили 55,6%. Наличие умеренно выраженного тубулоинтерстициального фиброза у данной группы регистрировалось в 88,9%.

В группе больных с IgA-нефропатией и ФСГС при проведении регрессионного логистического анализа были выделены факторы, ассоциирующиеся с риском формирования ЭМТ. Показано, что при отсутствии ЭМТ риск развития ХПН составил 8%, при наличии ЭМТ риск ХПН возрос до 55% ($t = 3,4$, $p = 0,003$).

Анализ выживаемости по Каплану–Майеру не продемонстрировал влияния ЭМТ на почечную выживаемость ($t = 1,1$, $p = 0,27$; $t = -1,0$, $p = 0,29$). В качестве признака почечной выживаемости была выбрана СКФ < 60 мл/мин/1,73 м².

ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки эпителиального фенотипа начинают мигрировать в интерстиций, образуя area fibrotica, развиваются фиброз интерстиция, фиброз почек, «констелляционная» система сигнальных белков данной локальной системы, на уровне нефрона, изменяется, оставляя после себя очаги и фокусы фиброза, которые мы видели в микропрепаратах почек пациентов [6].

Очаги ЭМТ чаще всего наблюдаются у больных на фоне умеренного фиброза интерстиция, однако, примечательно, что есть четкая патогенетическая связь между наличием ЭМТ и тяжестью заболевания.

Давность заболевания, на первый взгляд, была связана с наличием фиброза почек на фоне очагов ЭМТ, представляющих собой своего рода «каналы», по которым небольшим, но постоянным потоком в локальный очаг фиброза поступали новые фибробластоподобные клетки. Последние во все нарастающем количестве и чем дольше, тем больше, продуцировали интерстициальный матрикс, приводя, в конечном итоге, к трансформации его в тот вид, который был продемонстрирован в биоптатах наших пациентов – фиброз интерстиция, доходящий в отдельных случаях до 30–40%.

В заключение хочется отметить, что остается открытым вопрос, почему в вышеприведенных случаях клеточный генотип выбирает путь ЭМТ, а

не апоптоза, так как в обоих случаях активируется схожий сигнальный путь SMAD. Возможно, в данном случае активируется более эволюционно древняя часть генов, призывающая клетку к «спасению бегством» и активному функционированию [7–9].

Таким образом, анализируя процесс ЭМТ, в конечном счете подходим к фундаментальным биологическим и медицинским проблемам, затрагивающим сущность жизни клетки в сложно кооперированной многоклеточной иерархичной системе с множеством путей существования клеток и их взаимообменом и взаимосообщением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В завершение нашего исследования мы можем сделать следующие выводы. Согласно данным клинико-лабораторных исследований: уровень креатинина и протеинурии, степень снижения СКФ, нарушение почечной функции были выражены у больных с ЭМТ, чем у больных без ЭМТ. Более того, при проведении анализа выживаемости по Каплану–Майеру, что характеризует дальнейший прогноз данных пациентов, было выявлено, что в группе больных с ЭМТ чаще почечная выживаемость выглядит хуже, чем без ЭМТ.

При выделении IgA-нефропатии и ФСГС, проведении регрессионного логистического анализа были выделены факторы, ассоциирующиеся с риском формирования ЭМТ. Показано, что при отсутствии ЭМТ риск развития ХПН значительно ниже (8%), чем при наличии ЭМТ (55%).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Репин ВС, Сабурин ИИ. Обратимые эпителио-мезенхимальные трансформации клеток в эмбриогенезе и постнатальном обновлении тканей. *Клет транспл и тканевая инженерия* 2006; 1 (3): 64–72 [Repin VS, Saburina IN. Reversible epithelio-mesenchymal transformatsii cells in embryogenesis and postnatal tissue renewal. *Klet. transpl. i tkanevaja inzhenerija* 2006; 1 (3): 64–72]
2. Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 2004; 82(3): 175–181
3. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(1): 1–12
4. Biamonti G, Catillo M, Pignataro D et al. The alternative splicing side of cancer. *Semin. Cell Dev Biol* 2014; (14): 44–49
5. Василенко ИВ, Кондратьев РБ, Кудряшов АГ и др. Особенности эпителиально-мезенхимальной трансформации в раках различной локализации и гистологического строения. *Клин онкол* 2012; 5 (1): 163–167 [Vasilenko IV, Kondratjuk RB, Kudrjashov AG et al. Features of epithelial-mesenchymal transformation in cancers of different localization and histological structure. *Klinicheskaja onkologija* 2012; 5 (1): 163–167]
6. Okada H, Inoue T, Suzuki H, et al. Epithelial-mesenchymal transformation of renal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 15 (6): 44–46
7. Галишонов П, Гертиг А. Эпителиально-мезенхимальная трансформация как биомаркер почечного фиброза: готовы ли мы применить теоретические знания на практике? *Нефрология* 2013; 17 (4): 9–16 [Galishon P, Gertig A. Epithelial-mesenchymal transformation as a biomarker of renal fibrosis: are we ready to apply theoretical knowledge in practice? *Nefrologija* 2013; 17 (4): 9–16]
8. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest* 2011; 121 (2): 468–474
9. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson E. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J of Cell Biology* 2006; 172(7): 973–981

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 17.02.2015 г.

Принята в печать: 26.06.2015 г.