

© А.В.Смирнов, А.В.Карунная, М.И.Зарайский, В.Г.Сиповский, И.Г.Каюков, М.Хасун, М.М.Парастаева, Р.В.Зверьков, 2014
УДК 616.61:616-003.261

*А.В. Смирнов^{1,2}, А.В. Карунная², М.И. Зарайский³, В.Г. Сиповский¹,
И.Г. Каюков^{1,4}, М. Хасун, М.М. Парастаева, Р.В. Зверьков*

ЭКСПРЕССИЯ микроРНК-21 В МОЧЕ У ПАЦИЕНТОВ С НЕФРОПАТИЯМИ

¹Научно-исследовательский институт нефрологии, ²кафедра пропедевтики внутренних болезней, ³кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, ⁴кафедра нефрологии и диализа Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Россия

*A. V. Smirnov^{1,2}, A. V. Karunnaya², M. I. Zarayski³, V. G. Sipovski¹, I. G. Kayukov^{1,4},
M. Hasun, M. M. Parastaeva, R. V. Zver'kov*

URINARY microRNA-21 EXPRESSION IN NEPHROPATHIES

¹Nephrology Research Institute, ²Department of propaedeutics of internal diseases, ³Department of Clinical Laboratory Diagnostics with the course of Molecular Medicine, ⁴Department of Nephrology and Dialysis, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Russian Federation

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Определить уровень экспрессии микроРНК-21 в моче у пациентов с нефропатиями и сопоставить его с другими признаками поражения почек, в том числе морфологическими. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** В исследование включены 17 пациентов с нефропатиями, подтвержденными морфологически. У всех определены скорость клубочковой фильтрации, суточная протеинурия. Патоморфологические изменения в клубочках (глобальный, сегментарный склероз) оценены количественно; изменения в канальцах (атрофия) и интерстиции (фиброз) – полуколичественно (0 – нет изменений, 1 – до 25% в анализируемых срезах – изменения незначительно выражены, 2 – до 50% – изменения выражены умеренно, 3 – более 50% анализируемого объекта – выраженное изменение). Экспрессия микроРНК-21 в моче определялась при помощи реакции амплификации (RealTime PCR-протокол). Расчет проводился по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты экспрессии микроРНК-21 у больных сопоставлялись с данными, полученными при исследовании 10 здоровых лиц. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Уровень экспрессии микроРНК-21 в моче у пациентов с нефропатиями значимо выше, чем у здоровых лиц (0,3070 [нижний – верхний квартили: 0,1540; 0,4060] и 0,001 [0,0002; 0,0254] соответственно, $p=0,00024$). Уровень экспрессии микроРНК-21 в моче прямо коррелировал с выраженностью суточной протеинурии ($R_s=0,570$; $p<0,05$). При анализе морфологических изменений (гломерулярный, тубулоинтерстициальный склероз, атрофия канальцев) не выявлено корреляции с исследуемым уровнем экспрессии микроРНК-21 в моче. При этом уровень экспрессии микроРНК-21 в моче у пациентов с умеренно выраженной атрофией канальцев (0,354 [0,308; 0,933]; $n=7$) был значимо выше, чем с незначительными атрофическими изменениями (0,211 [0,033; 0,038]; $n=10$; $p=0,04$). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты работы свидетельствуют о том, что уровень экспрессии микроРНК-21 в моче может в определенной степени отражать тяжесть повреждения почек, в том числе выраженность морфологических изменений, однако необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Ключевые слова: микроРНК, микроРНК-21, тубулоинтерстициальный фиброз, трансформирующий фактор роста TGF β 1.

ABSTRACT

AIM OF RESEARCH. Determine the level of expression of miR-21 in the urine of patients with nephropathy and to compare it with other signs of kidney damage, including morphological. **PATIENTS AND METHODS.** Seventeen patients with different nephropathy confirmed by kidney biopsy were examined. Glomerular filtration rate was assessed by creatinine clearance, CKD-EPI formula. Daily urinary protein has been established. The degree of glomerulosclerosis was evaluated quantitatively; tubular atrophy, tubulointerstitial fibrosis were evaluated semi-quantitatively on a scale from one to three (0 – no changes; 1 – minor changes, 1-25%; 2 – moderate changes, 25-50%; 3 – severe changes, >50%). miR-21 expression in the urine was determined by a RT-PCR assay and calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ protocol. miR-21 expression in the urine of healthy donors ($n=10$) was taken as control. **RESULTS.** The level of miR-21 expression in the urine in patients with nephropathy were significantly higher than in control (0,3070 [the lower and the upper quartiles: 0,1540; 0,4060] vs 0,001 [0,0002; 0,0254] respectively; $P=0,00024$). There was strong positive correlation between urinary miR-21 and daily urinary protein ($R_s=0,570$; $P<0,05$). There were no correlations between urinary miR-21 and morphological changes (glomerular, tubulointerstitial sclerosis, tubular atrophy). However, the level of expression of miRNA-21 in the urine of patients with moderate atrophy of tubules (0,354 [0,308; 0,933]; $n=7$) was significantly higher than with minor one (0,211 [0,033; 0,038]; $n=10$; $P=0,04$). **CONCLUSION.** These data suggest that the level of miR-21 expression in the urine to a certain degree can be associated with the severity of renal damage in patients with nephropathies, including the severity of morphological changes, but further research is needed in this area.

Key words: microRNA, microRNA-21, tubulointerstitial fibrosis, transformation growth factor TGF β 1.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее динамично развивающихся и увлекательных направлений молекулярной биологии является изучение некодирующих белки РНК (нкРНК), хорошо известными представителями которых являются рибосомальная и транспортная РНК. Недавно был описан новый класс нкРНК – микроРНК (миРНК), представители которого по результатам многочисленных проведенных исследований вовлечены в развитие и прогрессирование целого ряда заболеваний [1–10].

миРНК – это некодирующие РНК длиной около 22 нуклеотидов, являющиеся мощными регуляторами экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Более 90% генов у млекопитающих находятся под их контролем. В геноме человека описаны более 2000 миРНК [11]. Кроме того, для миРНК характерна специфическая экспрессия среди тканей и типов клеток. миРНК-146а, миРНК-886, миРНК-192, миРНК-194, миРНК-204, миРНК-215 и миРНК-216 являются для почек специфическими, а миРНК-196а/б, миРНК-10а/б, миРНК-130, миРНК-146, миРНК-200а, миРНК-30а-е, миРНК-872 и миРНК-21 – высоко специфичны [12–14].

В настоящее время активно изучается возможное влияние миРНК в механизмах развития повреждения почечной ткани при различных нефропатиях. При большинстве почечных заболеваний развитие фиброза определяется комплексом механизмов (иммуновоспалительных, метаболических, гемодинамических), точную грань между ролью которых провести невозможно [15]. Однако на конечном этапе формирования фиброза основную роль играет экспрессия провоспалительных и профибротических цитокинов, которые, зачастую, начинают действовать вне зависимости от причин, вызвавших их активацию. Результаты некоторых исследований позволяют предположить, что миРНК-21 играет ведущую роль в развитии эпителиально-мезенхимальной трансформации и ренального фиброза [16–19].

В связи с этим целью нашей работы было сопоставить уровень экспрессии миРНК-21 в моче у пациентов с нефропатиями с другими признаками поражения почек, в том числе морфологическими.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 17 пациентов (М/Ж: 8/9; возраст 25–66 лет) с нефропатиями, подтвержденными морфологически. Клинически нефротический синдром был представлен в 10 случаях. Все пациенты находились на стационарном лечении

в клинике пропедевтики внутренних болезней ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Каждому пациенту выполнено комплексное функциональное обследование почек с определением скорости клубочковой фильтрации по клиренсу креатинина, расчетным формулам (СКД-EPI), определена суточная протеинурия.

Экспрессия миРНК-21 в моче определялась при помощи реакции амплификации (RealTime PCR-протокол). Расчет проводился по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты экспрессии миРНК-21 у больных сопоставлялись с данными, полученными при исследовании 10 практически здоровых лиц (М/Ж: 3/7; возраст 22–46 лет).

Изучение патоморфологических изменений проводилось в светооптическом микроскопе Carl Zeiss Imager Z 2 (Германия). Патоморфологические изменения в клубочках (глобальный, сегментарный склероз) оценивались количественно, а изменения в канальцах (атрофия/субатрофия) и интерстиции (фиброз) – полуколичественно (0 – нет изменений, 1 – до 25% в анализируемых срезах – изменения незначительно выражены, 2 – до 50% – изменения выражены умеренно, 3 – более 50% анализируемого объекта – выраженное изменение).

Для подтверждения морфологического диагноза использовались иммунофлюоресцентное исследование и в ряде случаев – электронная микроскопия. У 4 пациентов выявлена IgA-нефропатия, у 3 – фокально-сегментарный гломерулосклероз, у 2 – болезнь минимальных изменений, у 2 – мембранопрролиферативный гломерулонефрит, у 2 – AL-амилоидоз; другая патология – у 4.

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Statistica 6.0 for Windows). Использовались непараметрические методы: тест Манна–Уитни и коэффициент корреляции Спирмена. Уровень статистической значимости соответствовал $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Величина экспрессии миРНК-21 в моче у пациентов оказалась значимо выше, чем у здоровых лиц (рис. 1).

Уровень экспрессии миРНК-21 в моче прямо коррелировал с выраженностью суточной протеинурии (рис. 2).

В большинстве случаев статистически значимых связей между величиной мочевого экспрессии миРНК-21 и выраженностью морфологических повреждений почек не обнаружено. Однако выявлена значимо большая экспрессии миРНК-21 в моче у

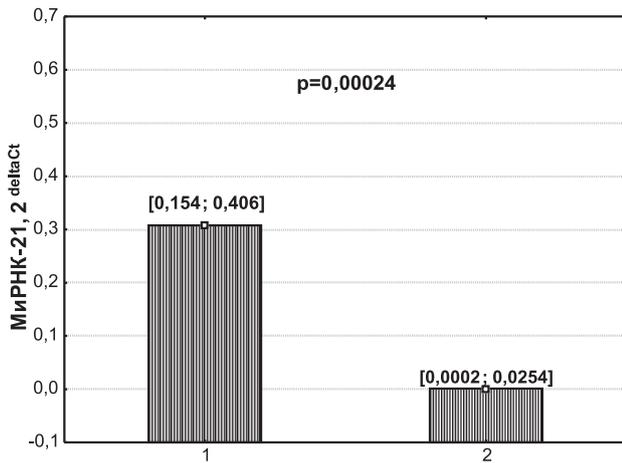


Рис. 1. Экспрессия миРНК-21 в моче (медианы) у пациентов (1) и здоровых лиц (2). В квадратных скобках указаны значения нижнего и верхнего квартилей для каждой группы.

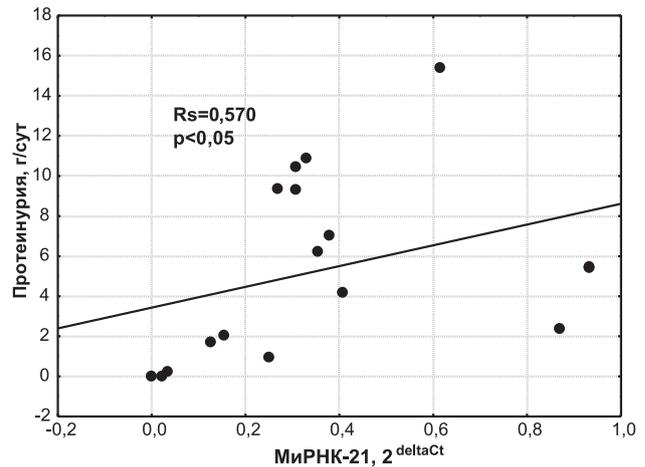


Рис. 2. Взаимосвязь величины суточной протеинурии с уровнем экспрессии миРНК-21 в моче.

пациентов с более выраженными атрофическими изменениями канальцев (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время миРНК-21 является наиболее изученной многофункциональной миРНК. Ее ген локализуется в межгенной области хромосомы 17q23.1, размер 72-й пары нуклеотидов, фланкирован белок-кодирующим геном ТМЕМ49. При этом ген миРНК-21 имеет свой собственный промотор и транскрибируется вне зависимости от ТМЕМ49.

В норме миРНК-21 широко экспрессируется во многих тканях и клетках человека. миРНК-21-нокаутные мыши являются жизнеспособными, дают потомство и не имеют отличий в гистологическом строении. Это позволило сделать вывод о том, что миРНК-21 не является обязательным компонентом для нормального развития организма [16]. При повреждении тканей, особенно при остром инфаркте миокарда [20, 21] и остром повреждении почек [22], миРНК-21 является одной из наиболее активируемых. Длительная избыточная активация миРНК-21 ведет к развитию фиброза. Этот факт подтвержден в целом ряде моделей сердечного [23], легочного [24] и почечного [19, 25] фиброза. Последняя представлена односторонней обструкцией мочеточника у крыс. Введение же олионуклеотидов – ингибиторов миРНК-21 замедляет процессы фиброобразования [19, 25]. Поэтому в настоящее время возможность ингибирования миРНК-21 является новой лечебной стратегией. Все указанное выше позволило нам выбрать миРНК-21 для настоящего исследования у пациентов с нефропатиями. Мы не останавливаемся в этой работе на деталях

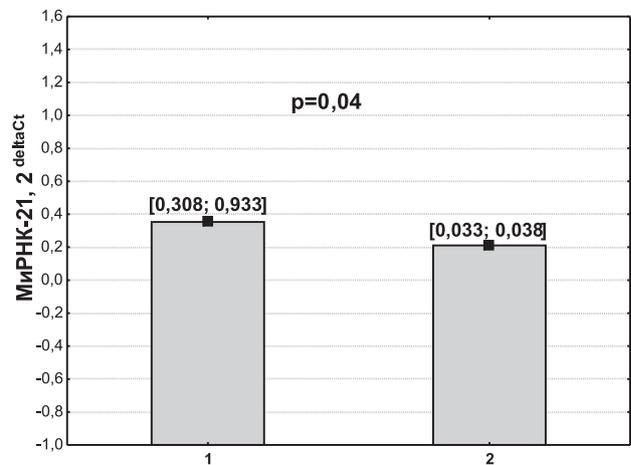


Рис. 3. Экспрессия миРНК-21 в моче (медианы) у пациентов с умеренно (1; n=7) и незначительно (2; n=10) выраженной атрофией канальцев (в квадратных скобках указаны значения нижнего и верхнего квартилей для каждой группы).

биогеनेза миРНК, который достаточно широко описан в англоязычной литературе [10, 16]. Этому планируется посвятить отдельную статью. Укажем лишь на то, что на первом этапе после транскрипции образуется при-миРНК, которая затем превращается в пре-миРНК, а уже в дальнейшем образуется зрелая форма миРНК.

Молекулярные механизмы, через которые миРНК-21 приводит к развитию фиброза, активно изучаются. Одним из таких механизмов является TGF β /Smad-система, которая стимулирует ядерный фактор транскрипции NF- κ B, который, в свою очередь, опосредует выработку провоспалительных цитокинов, прежде всего, фактора некроза опухолей α (TNF- α) и интерлейкина-1 β (IL-1 β) [8, 18, 19, 25].

Не вызывает сомнения, что TGF β 1 является ключевым медиатором прогрессирования почечно-

го фиброза [26, 27]. TGF β 1 и его изоформы (TGF β 2 и TGF β 3) синтезируются многими клетками, включая все типы клеток почек, и секретируются в виде латентных предшественников. Связывание активированного TGF β со своим рецептором приводит к фосфорилированию ряда Smad (Sma and Mad related proteins) белков, а именно активируемых рецептором Smads (R-Smads). R-Smads затем связываются с так называемым общим Smad-белком (Smad 4), образуя гетеродимерный комплекс. Этот комплекс проникает в ядро, где связываясь с SBE-элементами (Smad binding element) промотерных участков генов-мишеней, регулирует транскрипцию.

Так недавнее исследование показало, что R-Smads в фибробластах, гладкомышечных клетках сосудов, эпителиальных клетках канальцев связываются с SBE-элементом, расположенном в промоторе гена миРНК-21, запуская таким образом транскрипцию ее предшественников [25, 28]. миРНК-21, в свою очередь, подавляет Smad7, который является ингибитором TGF β /Smad-пути.

Кроме того, миРНК-21 также способствует развитию и прогрессированию фиброза при помощи других механизмов, таких как, например, активация ERK/MAP-киназы [23].

Что касается результатов проведенной работы, то вполне ожидаемой оказалась прямая корреляция между уровнем экспрессии миРНК-21 в моче и выраженностью суточной протеинурии.

При оценке морфологических изменений отсутствие в большинстве случаев отчетливых корреляций с уровнем экспрессии миРНК-21 в моче обусловлено, по-видимому, как небольшим объемом исследуемой группы пациентов, так и значительной ее разнородностью. Кроме того, стоит обратить внимание на сравнительно малую выраженность большинства морфологических изменений в биоптатах.

Однако необходимо отметить, что уровень экспрессии миРНК-21 в моче значимо повышается при нарастании выраженности атрофии канальцев от незначительной до умеренной (см. рис. 3). При этом в экспериментальных работах показано, что наибольшая экспрессия миРНК-21 характерна для эпителиальных клеток канальцев [19]. Почечный фиброз характеризуется апоптозом и некрозом тубулярных клеток, лейкоцитарной инфильтрацией, пролиферацией тубулоинтерстициальных фибробластов, накоплением интерстициального матрикса [25] и является конечной стадией повреждения почек. С учетом того, что у большинства наших больных не имелось резко выраженных морфоло-

гических повреждений, можно предположить, что выявленная ассоциация между уровнем экспрессии миРНК-21 и выраженностью тубулярной атрофии отражает начальные этапы формирования тубулоинтерстициального фиброза.

Косвенно в пользу значимости миРНК-21 в развитии фибротической трансформации почек может свидетельствовать и выявленная нами корреляция уровня мочевой экспрессии данной миРНК с величиной протеинурии (см. рис. 2) – общеизвестного предиктора как гломерулярного, так и тубулоинтерстициального фиброза.

Очевидно, однако, что роль различных микроРНК, в том числе, и миРНК-21 в развитии повреждений почек при различных нефропатиях нуждается в дальнейшем изучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы свидетельствуют о том, что уровень экспрессии миРНК-21 в моче может в определенной степени отражать тяжесть повреждения почек, в том числе выраженность морфологических изменений, однако необходимы дальнейшие исследования в этой области.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Kataoka M, Wang DZ. Non-Coding RNAs Including miRNAs and lncRNAs in Cardiovascular Biology and Disease. *Cells* 2014 Aug 22;3(3):883-898.
2. Condorelli G, Latronico MV, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol* 2014 Jun 3;63(21):2177-2187.
3. Gharipour M, Sadeghi M. Pivotal role of microRNA-33 in metabolic syndrome: A systematic review. *ARYA Atheroscler* 2013 Nov;9(6):372-376.
4. Rebane A, Akdis CA. MicroRNAs in allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014 Apr;14(4):424.
5. Hartl M, Grunwald Kadow IC. New roles for „old“ microRNAs in nervous system function and disease. *Front Mol Neurosci* 2013 Dec 24;6:51.
6. Finch ML, Marquardt JU, Yeoh GC, Callus BA. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2014 Sep;54C:288-303.
7. Tanase CP, Neagu AI, Necula LG et al. Cancer stem cells: Involvement in pancreatic cancer pathogenesis and perspectives on cancer therapeutics. *World J Gastroenterol* 2014 Aug 21;20(31):10790-10801.
8. Смирнов АВ, Кучер АГ, Добронравов ВА и др. Диетарный соевый протеин замедляет развитие интерстициального почечного фиброза у крыс с односторонней обструкцией мочеточника: введение в нутритивную эпигеномику. *Нефрология* 2012; 16(4):75-83
9. Смирнов АВ, Кучер АГ, Добронравов ВА и др. Диетарный соевый протеин замедляет развитие интерстициального почечного фиброза у крыс с односторонней обструкцией мочеточника: введение в нутритивную эпигеномику. *Нефрология* 2012; 16(4):75-83].
10. Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ. Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer. *Curr Biol* 2014 Aug 18;24(16):R762-R776.
11. Qingqing W, Qing-Sheng M, Zheng D. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB Life* 2013 July;

65(7):602–614.

12. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39:D152-157.

13. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007;129(7):1401-1414.

14. Sun Y, Koo S, White N et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res* 2004;32(22):e188.

15. Chandrasekaran K, Karolina DS, Sepsamaniam S et al. Role of microRNAs in kidney homeostasis and disease. *Kidney Int* 2012;81(7):617-627.

16. Lan HY. Diverse Roles of TGF- β /Smads in Renal Fibrosis and Inflammation. *Int J Biol Sci* 2011; 7(7): 1056–1067.

17. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol* 2011 Sep-Oct; 8(5):706–713.

18. Duffield JS, Grafals M, Portilla D. MicroRNAs are potential therapeutic targets in fibrosing kidney disease: lessons from animal models. *Drug Discov Today Dis Models* 2013 Fall;10(3):e127-e135.

19. Patel V, Noureddine L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* Jul 2012; 21(4):410–416.

20. Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A et al. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *Am J Physiol Renal Physiol* Oct 2011;301(4):F793–F801.

21. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010 November; 31(22):2765–2773.

22. Shi B, Guo Y, Wang J, Gao W. Altered expression of microRNAs in the myocardium of rats with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord* 2010;10:11.

23. Godwin JG, Ge X, Stephan K et al. Identification of a microRNA signature of renal ischemia–reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14339–14344.

24. Thum T, Gross C, Fiedler J et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;456:980–984.

25. Liu G, Friggeri A, Yang Y et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 2010;207:1589–1597.

26. Zhong X, Chung AC, Chen HY et al. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1668–1681.

27. Bottinger EP. TGF- β in renal injury and disease. *Semin Nephrol* 2007; 27: 309-320.

28. Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor- β and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)* 2005;10(1):48-56.

29. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008;454:56–61.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 12.05.2014 г.

Принята в печать: 02.09.2014 г.