

© 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<sup>1,2</sup>, А.В. Карунная<sup>2</sup>, М.И. Зарайский<sup>3</sup>, В.Г. Сиповский<sup>1</sup>,  
И.Г. Каюков<sup>1,4</sup>, М. Хасун, М.М. Парастаева, Р.В. Зверьков*

## ЭКСПРЕССИЯ микроРНК-21 В МОЧЕ У ПАЦИЕНТОВ С НЕФРОПАТИЯМИ

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

*A.V. Smirnov<sup>1,2</sup>, A.V. Karunnaya<sup>2</sup>, M.I. Zarayski<sup>3</sup>, V.G. Sipovski<sup>1</sup>, I.G. Kayukov<sup>1,4</sup>,  
M. Hasun, M.M. Parastaeva, R.V. Zver'kov*

## URINARY microRNA-21 EXPRESSION IN NEPHROPATHIES

<sup>1</sup>Nephrology Research Institute, <sup>2</sup>Department of propaedeutics of internal diseases, <sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory Diagnostics with the course of Molecular Medicine, <sup>4</sup>Department 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 светоптическом 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

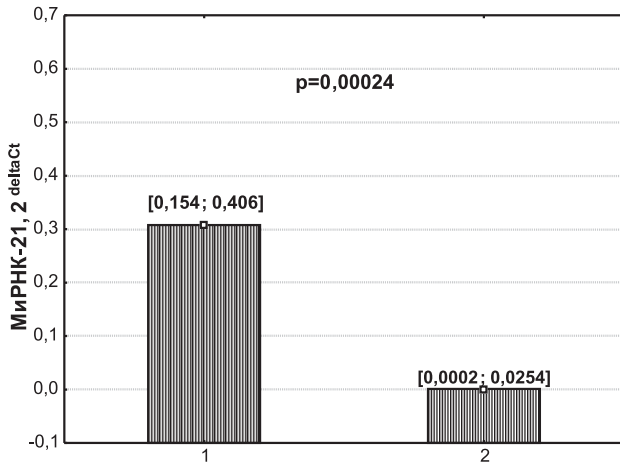


Рис. 1. Экспрессия миРНК-21 в моче (медианы) у пациентов (1) и здоровых лиц (2). В квадратных скобках указаны значения нижнего и верхнего квартилей для каждой группы.

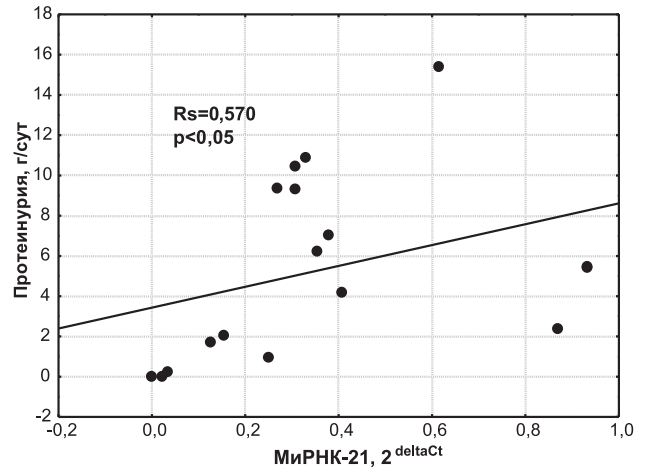


Рис. 2. Взаимосвязь величины суточной протеинурии с уровнем экспрессии миРНК-21 в моче.

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

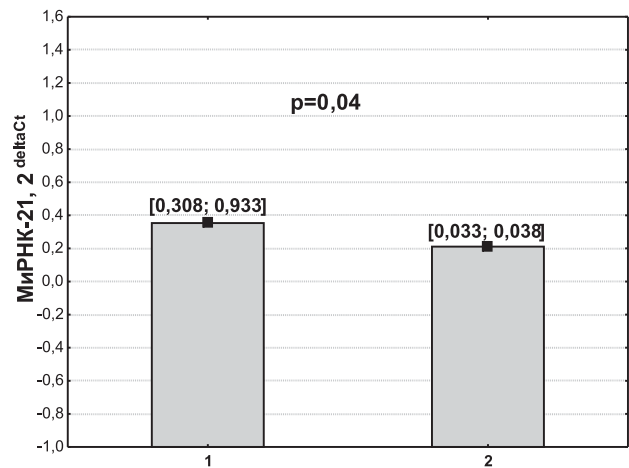


Рис. 3. Экспрессия миРНК-21 в моче (медианы) у пациентов с умеренно (1; n=7) и незначительно (2; n=10) выраженной атрофией канальцев (в квадратных скобках указаны значения нижнего и верхнего квартилей для каждой группы).

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 TGFβ/Smad-система, которая стимулирует ядерный фактор транскрипции NF-κB, который, в свою очередь, опосредует выработку провоспалительных цитокинов, прежде всего, фактора некроза опухолей α (TNF-α) и интерлейкина-1β (IL-1β) [8, 18, 19, 25].

Не вызывает сомнения, что TGFβ1 является ключевым медиатором прогрессирования почечно-

го фиброза [26, 27]. TGF $\beta$ 1 и его изоформы (TGF $\beta$ 2 и TGF $\beta$ 3) синтезируются многими клетками, включая все типы клеток почек, и секретируются в виде латентных предшественников. Связывание активированного TGF $\beta$  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 $\beta$ /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- $\beta$ /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- $\beta$  in renal injury and disease. *Semin Nephrol* 2007; 27: 309-320.

28. Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor- $\beta$  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.