

*Пасечник Д. Г.,
руководитель Центральной научно-исследовательской лаборатории
ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

РОЛЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В ГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК И ПОЧЕЧНО- КЛЕТОЧНОГО РАКА (ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ)

Аннотация. Эпителиально-мезенхимальный переход – это процесс, при котором эпителиальные клетки утрачивают присущие им свойства (межклеточную адгезию и апикально-базальную полярность) и приобретают свойства мезенхимальных клеток (веретеновидная форма, подвижность и синтез компонентов внеклеточного матрикса). ЭМП может лежать в основе развития и прогрессии многих патологических процессов в почке и отражает адаптивные изменения в клетках в ответ на повреждение или изменение активности генов при опухолевом росте. Изучение молекулярных механизмов ЭМП открывает возможности развития таргетной терапии интерстициального фиброза, индивидуальной оценки риска его развития.

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, почечный фиброз, почечно-клеточный рак.

Постановка проблемы. Последние десятилетия внедрение методов молекулярно-биологического исследования позволили по новому взглянуть на пато- и морфогенез заболеваний почек. Одним из важных путей прогрессии хронических не-опухолевых и опухолевых заболеваний почек является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), как отражение пластичности дифференцировки эпителия.

Изложение основного материала исследования.

Определение и сущность эпителиально-мезенхимального перехода. Долгое время считалось, что эпителиальные клетки являются терминально дифференцированными, обеспечивая стабильность и оптимальное функционирование тканевых структур.

Ключевыми маркерами эпителиального фенотипа являются молекулы межклеточных контактов: плотных (клаудины, окклюдины, JAM, CAR, CLMP), адгезивных (якорных) (кадгерины), щелевых (коннексины) и десмосом (десмоглеин, десмоколлин), обеспечивающих формирование стабильного непрерывного слоя клеток; молекулы, обеспечивающие апикально-базальную полярность (Crumb, Par, Scribble [1]).

В отличие от эпителия, клетки мезенхимы не образуют четких тканевых структур, не имеют плотных контактов, апикально-базальной полярности и базальной мембраны, способны менять форму, подвижны, могут перемещаться во внеклеточном матриксе.

Исследование Е. Нау (1995) на примере развития примитивной полоски у куриного эмбриона впервые продемонстрировало пластичность фенотипа эпителиальных клеток и возможность приобретения ими свойств мезен-

химы [2]. Данные изменения были обозначены как эпителиально-мезенхимальный переход (transition) [3]. В дальнейшем данный феномен был продемонстрирован не только в период эмбрионального развития, но и в постнатальном периоде при репарации тканей, развитии фиброза органов, прогрессии опухоли.

В настоящее время под ЭМП понимают процесс, при котором эпителиальные клетки утрачивают присущие им свойства (межклеточную адгезию и апикально-базальную полярность) и приобретают свойства мезенхимальных клеток (веретеновидная форма, реорганизация цитоскелета с появлением стрессорных фибрилл, подвижность и синтез компонентов внеклеточного матрикса). ЭМП – это эволюционно закрепившийся процесс, связанный с переходом от одноклеточных организмов к многоклеточным и обеспечивающий перемещение эмбриональных клеток, дающих начало новым специализированным тканям и органам. Однако при изменении условий существования тканей в постэмбриональном периоде, при воздействии повреждающих факторов, в процессе канцерогенеза возможна активация генетических программ ЭМП. R. Kalluri и соавторы (2009) предложили разделить ЭМП на три типа. Первый тип ЭМП связан с эмбриогенезом, он носит временную и пространственную запрограммированность, обеспечивает перемещение эпителиальных клеток и формирование новых тканей, может быть обратимым, не сопровождается фиброзом, деструкцией и неконтролируемым ростом клеток. Второй тип ЭМП развивается при повреждении клеток, репарации и воспаления в тканях и может лежать в основе фиброобразования органов. Третий тип ЭМП характерен для опухолевой трансформации клеток и определяет появление у них свойств инвазии и метастазирования. Он связан с генетическими и эпигенетическими изменениями онкогенов и супрессорных генов.

Молекулярно-биологические изменения при ЭМП можно условно разделить на несколько групп:

1) подавление экспрессии генов и молекул, определяющих эпителиальный фенотип, – белков межклеточной адгезии (Е-кадгерина, десмоплакинов, окклюдина, клаудина), белков цитоскелета (цитокератинов), белков, определяющих апикально-базальную полярность, белков, связанных с базальной мембраной (коллаген-IV, нидоген/энтаттин, ламинин-1, сульфатированные протеоглики), микроРНК, поддерживающие эпителиальный фенотип (микроРНК 200);

2) появление молекул, определяющих мезенхимальный фенотип, – белков межклеточных контактов (N-ка-

дгерин, ОВ-кадгерин), белков цитоскелета (виментин, α -гладкомышечный актин), факторов сигнальной трансдукции и транскрипции (Snail1, Snail2 (Slug), Twist, Goosecoid, FOXC2, E47, E2, Sox10, Ets, Rho), белков, обеспечивающих связь клеток с внеклеточным матриксом и его ремоделирование (интегрины $\alpha\beta6$ и $\alpha5\beta1$, металлопротеазы-2,3,9, фибронектин), белков, связанных с синтезом коллагена (фибробласт-специфический белок 1 (Fsp1), белок теплового шока 47 (HSP47), микроРНК, подавляющих гены, связанные с эпителиальным фенотипом (микроРНК 10b,21) [4; 5].

Ключевыми признаками ЭМП, по признанию многих авторов, является утрата экспрессии Е-кадгерина, связанная с активацией факторов транскрипции Snail1, Snail2 (Slug), ZEB1, Sip1/ZEB2, E2A, и реорганизация актиновых фибрилл с их полимеризацией, формированием стрессорных волокон вследствие активации факторов транскрипции Twist1 и MRTF. K. Lee и соавторы (2012) указывают на возможность иерархической активации факторов транскрипции, что определяет этапность развития ЭМП [5].

Основными иницирующими факторами, запускающими программу ЭМП, являются факторы роста и цитокины, кислородный стресс и активные формы кислорода, гипоксия, механический стресс, компоненты внеклеточного матрикса, в том числе образующиеся при его деградации, продукты конечного гликозилирования, микробные патогены.

Ключевыми сигнальными путями, связанными с активацией ЭМП, являются такие: PI3K/AKT, MAPK-связанные (Ras/Raf/MEK1,2/Erk1,2; TAK1/p38; JNK), FAK/RAC, Smad2,3/Smad4, Wnt/ β -катенин/LEF/TCF, Sonic Hedgehog/PTCH/Gli, Rho/ROCK/LIM, Rac/Cdc42-PAK1, JAK/Stat, Jagged1/Notch [6; 7; 8].

Важными молекулами, регулирующими процесс ЭМП, являются трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF- β 1) и белок NF- κ B. Они во многом обеспечивают интеграцию адаптивных изменений в тканях, возникающих при повреждении и воспалении, одним из компонентов которых является ЭМП [7;8].

Актуальными являются и исследования о возможной роли ангиотензина-II в регуляции ЭМП. Ангиотензин-II через первый тип рецепторов активирует экспрессию многих сигнальных путей и факторов роста, участвующих в процессе ЭМП (TGF- β 1, CTGF, VEGF, PDGF, NF κ B, Smad2/3, p38/MAPK, Rho/ROCK), а также влияет на ремоделирование внеклеточного матрикса, увеличивая синтез коллагена 1 типа и подавляя активность металлопротеаз [9].

Последние годы внимание исследователей стала привлекать роль микроРНК в регуляции развития ЭМП. Известно, что микроРНК – это класс некодирующих РНК, влияющих на посттранскрипционную активность генов. Установлено, что семейство микроРНК200, микроРНК205 поддерживают эпителиальный фенотип клеток, подавляя экспрессию фактора транскрипции ZEB1 и SIP1, сохраняя экспрессию Е-кадгерина, тогда как микроРНК155, активируя гены, связанные с мезенхимальным фенотипом клеток.

Особый интерес представляет факт, что многие регуляторные пути, задействованные в ЭМП, вовлечены в переход клеток к фенотипу плюрипотентных стволовых клеток [10].

Фиброз почки и ЭМП. Основной причиной, приводящей к стойкой утрате почечной функции при хронических заболеваниях почек, является фиброз интерстиция, связанный с прогрессивным накоплением внеклеточного матрикса в следствие активации миофибробластов. До сих пор проблема почечного фиброза остается во многом неразрешимой и имеет не только медицинское, но и большое социально-экономическое значение, так как хроническая почечная недостаточность, развивающаяся в его исходе, требует больших затрат на различные виды заместительной терапии.

Долгое время считалось, что ключевым в развитии фиброза интерстиция является активация резидентных фибробластов и их трансформация в миофибробласты как основной источник внеклеточного матрикса. Новый взгляд на проблему почечного фиброза связан с работой Strutz и соавторов (1995), впервые продемонстрировавших на экспериментальной модели ТИН у мышей появление экспрессии в тубулярном эпителии – белка FSP1, считавшегося маркером фибробластов [11]. Второй базовой работой было исследование М. Iwano и соавторов (2002), выявившее на модели односторонней обструктивной нефропатии ко-экспрессию в поврежденном тубулярном эпителии и перитубулярном интерстиции маркеров эпителиальных и мезенхимальных клеток (LacZ, FSP1, HSP47) [12]. В это же время появляются первые исследования, которые обнаружили экспрессию маркеров ЭМП в нативной почке при различных формах гломерулопатий. При этом отмечена и связь между этими изменениями, степенью фиброза интерстиция и нарушением почечной функции [13; 14].

Обобщенно гипотезу о роли ЭМП в генезе почечного фиброза можно представить следующим образом. Повреждение эпителия приводит к дезинтеграции межклеточных связей и связей между клетками и базальной мембраной, активации программ адаптации, сводящихся либо к активации апоптоза и атрофии эпителия, либо ЭМП с миграцией фенотипически измененных клеток в интерстиций, где они окончательно приобретают свойства миофибробластов. Данная адаптационная пластичность эпителия отражает особенности эмбрионального развития нефротелия, который возникает благодаря приобретению свойств эпителия клетками метанефральной мезенхимы. Длительное воздействие повреждающего фактора, развитие ЭМП и фиброза интерстиция могут приводить к формированию положительных обратных связей, что делает процессы непрерывно прогрессирующими.

Возможными повреждающими факторами, иницирующими ЭМП, являются гипоксия и ишемия ткани, механический стресс вследствие изменения характера тока мочи, воздействие микробных патогенов, химических токсинов, радиации, медиаторов воспаления, изменения структуры и состава внеклеточного матрикса.

Процессы ЭМП и прогрессирующего фиброза интерстиция могут носить многоступенчатый характер. Эта этапность может быть связана с постепенной активацией различных молекулярных программ, связанных с ЭМП. А. Masszi и соавторы (2011) выделили две фазы ЭМП: мезенхимальную и миогенную. Первая фаза связана с активацией TGF- β 1/SMAD2+3-программы и сопровождается утратой эпителиального фенотипа, нарушением межкле-

точных контактов, повышенным синтезом внеклеточного матрикса и его реорганизацией. Во вторую фазу происходит активация генов MRTF/CARF, приводящая к появлению стрессорных актиновых волокон в клетке, одновременным снижением экспрессии SMAD3 и стимуляцией его протеасомной деградации. При этом синтез внеклеточного матрикса подавляется и происходит сокращение новообразованной соединительной ткани. Многоступенчатость ЭМП объясняет существование «переходных» форм клеток, сочетающих свойства как эпителия, так и мезенхимы. А. Hertig (2008) показал, что изменение экспрессии генов, ассоциированных с ЭМП, предшествует развитию морфологической картины фиброза, что позволяет использовать их в оценке риска развития этого процесса [15].

Скорость развития ЭМП и фиброза интерстиция остается неясной. Предполагается, что на первых этапах фиброз связан только с активацией резидентных фибробластов и миофибробластов. Признаки ЭМП тубулярного эпителия возникают позже, после длительной экспрессии повреждающего фактора. Однако на экспериментальной модели обструктивного инфекционного пиелонефрита мы обнаружили признаки выраженного фиброза интерстиция и фенотипические изменения эпителия канальцев, сходные с ЭМП через 14–21 день от начала развития процесса [16]. Вероятно, скорость и динамика развития фиброза и ЭМП во многом зависят от особенностей факторов повреждения и их потенцирующего действия.

Сложности в оценке ЭМП нередко связаны с тем, какие маркеры относить к эпителиальной и мезенхимальной дифференцировке, так как они могут иметь тканевую специфичность, отражающую особенности эмбрионального происхождения клеток. Например, экспрессия Е-кадгерина наблюдается преимущественно в эпителии дистальных извитых канальцев и собирательных протоков и мало выражена в эпителии проксимальных извитых канальцев, что не позволяет считать изменения его экспрессии адекватным маркером ЭМП для этого сегмента нефрона.

Р. Galichon (2011) считает, что правильнее искать экспрессию новых мезенхимальных маркеров, чем оценивать утрату эпителиальных, так как оценить это количественно не всегда легко. Оптимальным маркером ранних этапов ЭМП является виментин, экспрессия которого отсутствует в нормальном нефротелии, а его появление указывает на перестройку цитоскелета, влекущую изменение функции. Другими возможными кандидатами разных этапов ЭМП могут быть α -гладкомышечный актин и белок теплового шока HSP47, характерные для миофибробластов и ассоциированные с синтезом коллагена, β -катенин, высвобождающийся при нарушении кадгерин-ассоциированных адгезивных контактов в эпителии [17].

Во многом не решенным остается вопрос о способности к ЭМП различных сегментов нефрона. Большинство исследований ЭМП основаны на культурах клеток, полученных из эпителия проксимальных и дистальных извитых канальцев. Однако на моделях с использованием эпителия собирательных протоков эта возможность не была показана. Возможно, это связано с различным происхождением этих сегментов нефрона в эмбриогенезе. Также не ясна судьба клеток, подвергшихся ЭМП *in vivo*. Не известно, может ли этот процесс быть обратимым при устранении действия повреждающего фактора.

Рак почки и ЭМП. Роль ЭМП в развитии и прогрессии рака почки только начинает изучаться. Сравнительный геномный анализ выявил, что для почечно-клеточного рака характерна активация генов, связанных с сигнальными системами, обеспечивающими ЭМП, и связанных с развитием мезенхимальных стволовых клеток в эмбриогенезе [18; 19; 20]. Появление маркеров ЭМП в клетках рака продемонстрировано иммуногистохимически [21; 22]. Интересны сообщения о возможной связи гена VHL и ЭМП. При утрате его активности, что характерно для светлоклеточного рака, отмечается утрата экспрессии Е-кадгерина и появление экспрессии виментина и N-кадгерина [23].

Как пример ЭМП рассматривается и саркоматоидная трансформация различных вариантов почечно-клеточного рака. Для этой формы рака характерны веретеновидная форма клеток, повышение активности Snail1, SPARC, Wnt- β -катенинового пути, экспрессия Е-кадгерина [24].

Изучение ЭМП при эпителиальных опухолях почек имеет большое значение, так как может обуславливать неблагоприятный прогноз и резистентность новообразований к различным видам терапии, в том числе таргетной.

Выводы. ЭМП может лежать в основе развития и прогрессии многих патологических процессов в почке и отражает адаптивные изменения в клетках в ответ на повреждение или изменение активности генов при опухолевом росте. Тем не менее, многие вопросы требуют уточнения. Существует ли ЭМП *in vivo* и каково его значение в прогрессирующем фиброзе и опухолевой трансформации? Обратим ли ЭМП?

Перспективными будут исследования, направленные на поиск специфических маркеров ЭМП, уточняющих особенности развития этого процесса и фиброза интерстиция при различных заболеваниях почек, индивидуальной оценки риска его развития по данным биопсии. Изучение молекулярных механизмов ЭМП открывает возможности развития таргетной терапии интерстициального фиброза и рака почки.

Литература:

1. Pieczynski J., Margolis B. Protein complexes that control renal epithelial polarity // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2011. – № 300 (3). – F. 589–601.
2. Hay E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation // *Acta Anat.* – 1995. – № 154. – P. 8–20.
3. Kalluri R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells // *J Clin Invest.* – 2009. – № 119. – P. 1417–1419.
4. Lee J.M., Dedhar S., Kalluri R., Thompson E. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease // *The Journal of Cell Biology.* – 2006. – № 172 (7). – P. 973–981.
5. Lee K., Nelson C. New Insights into the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis // *Int. Review of Cell and Molecular Biology.* – 2012. – № 294. – P. 171–221.
6. Burns W., Thomas M. Angiotensin II and Its Role in Tubular Epithelial to Mesenchymal Transition Associated with Chronic Kidney Disease // *Cells Tissues Organs.* – 2011. – № 193. – P. 74–84.
7. Masszi A., Kapus A. Smad3 Complexity: The Role of Smad3 in Epithelial-Myofibroblast Transition // *Cells Tissues Organs.* – 2011. – № 193. – P. 41–52.
8. Liu Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention // *J Am Soc Nephrol.* – 2004. – № 15. – P. 1–12.
9. Ruster C., Wolf G. Angiotensin II as a Morphogenic Cytokine Stimulating Renal Fibrogenesis // *J Am Soc Nephrol.* – 2011. – № 22. – P. 1189–1199.

10. Cheung A., Phoon Y., Lung H. et al. Roles of Tumor Suppressor Signaling on Reprogramming and Stemness Transition in Somatic Cells In: Future aspects of tumor suppressor gene. – Ed. by Yue Cheng : INTECH, 2013. – P. 75–96.
11. Strutz F., Okada H., Lo CW et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1 // *J Cell Biol.* – 1995. – № 130 (2). – P. 393–405.
12. Iwano M., Plieth D., Danoff T. et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis // *J Clin Invest.* – 2002. – № 110 (3). – P. 341–350.
13. Jinde K., Nikolic-Paterson D.J., Huang X.R. et al. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis // *Am J Kidney Dis.* – 2001. – № 38. – P. 761–769.
14. Rastaldi M.P., Ferrario F., Giardino L. et al. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies // *Kidney Int.* – 2002. – № 62. – P. 137–146.
15. Hertig A. La Transition Épithélio-Mésenchymateuse (TEM), marqueur prédictif d'évolution de NCA? // *Nephrol Ther.* – 2008. – № 4. – Suppl 1. – P. 25–28.
16. Коган М.И., Пасечник Д.Г., Набока Ю.Л. и соавт. // *Урология.* – 2012. – № 2. – С. 8–13.
17. Galichon P., Hertig A. Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: are we ready for the bedside? // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2011. – № 6. – P. 4–11.
18. Tun H.W., Marlow L.A., von Roemeling C.A. et al. Pathway signature and cellular differentiation in clear cell renal cell carcinoma // *PLoS One.* – 2010. – № 5 (5). – S. 1–14.
19. Hongjuan Zh., Zongming M., Robert T. et al. Alteration of Gene Expression Signatures of Cortical Differentiation and Wound Response in Lethal Clear Cell Renal Cell Carcinomas // *PLoS ONE.* – 4(6). – E. 6039.
20. Chen D., Gassenmaier M., Maruschke M. et al. Expression and Prognostic Significance of a Comprehensive Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Set in Renal Cell Carcinoma // *J Urol.* – 2014. – № 191 (2). – S. 479–86.
21. Harada K., Miyake H., Kusuda Y., Fujisawa M. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy // *BJU Int.* – 2012. – № 110 (11 Pt C). – E. 1131–7.
22. Buchner A., Riesenberger R., Pohla H. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in metastatic renal cell carcinoma and prognostic relevance of involved genes // *J Urol.* – 2013. – № 189 (4S). – E. 246.
23. Pantuck A., An J., Liu H., Retti M. NF-κB-Dependent Plasticity of the Epithelial to Mesenchymal Transition Induced by Von Hippel-Lindau Inactivation in Renal Cell Carcinomas // *Cancer Res.* – 2010. – № 70. – S. 752–761.
24. Conant J., Peng Z., Evans M. et al // *J Clin Pathol.* – 2011. – № 64 (12). – S. 1088–92.

Пасічник Д. Г. Роль епітеліальної-мезенхімального переходу в генезі хронічної хвороби нирок і нирково-клітинного раку (проблеми та перспективи)

Анотація. Епітеліально-мезенхімальний перехід – це процес, за якого епітеліальні клітини втрачають притаманні їм властивості (міжклітинну адгезію й апікально-базальну полярність) і набувають властивостей мезенхімальних клітин (веретеноподібна форма, рухливість і синтез компонентів позаклітинного матриксу). ЕМП може лежати в основі розвитку та прогресії багатьох патологічних процесів у нирці і відображає адаптивні зміни у клітинах у відповідь на пошкодження або зміну активності генів за пухлинного росту. Вивчення молекулярних механізмів ЕМП відкриває можливості розвитку таргетної терапії інтерстиціального фіброзу, індивідуальної оцінки ризику його розвитку.

Ключові слова: епітеліально-мезенхімальний перехід, нирковий фіброз, нирково-клітинний рак.

Pasechnik D. The role of epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of chronic kidney disease and renal cell carcinoma (problems and prospects)

Summary. Epithelial-mesenchymal transition is a process in which epithelial cells lose their intrinsic properties (cell-cell adhesion and apical-basal polarity) and acquire properties of mesenchymal cells (spindle-shape, motility and synthesis of extracellular matrix components). EMT may underlie the development and progression of many pathological processes in the kidney and reflects the adaptive changes in the cells in response to an injury or change of the gene activity in tumor growth. The study of the EMT molecular mechanisms opens up opportunities for the development the interstitial fibrosis target therapy and fibrosis development risk individual assessment.

Key words: epithelial-mesenchymal transition, renal fibrosis, renal cell carcinoma.