

ID: 2014-01-1276-A-3333

Оригинальная статья

Маслякова Г.Н., Росоловский А.Н., Напшева А.М.

## Эпителиально-мезенхимальная трансформация как фактор прогрессирования хронической болезни почек

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии

### Введение

Согласно определению, под термином «хроническая болезнь почек» стоит понимать наличие любых маркеров повреждения почек, персистирующих в течение трех месяцев вне зависимости от нозологического диагноза. При этом среди маркеров повреждения почек отмечаются такие показатели, как альбуминурия, стойкие изменения в осадке мочи, результаты данных визуализирующих методов исследования, снижение скорости клубочковой фильтрации, а также результаты прижизненного морфологического исследования нефробиопсий. Термин ХБП появился в 2002 году, когда официально был опубликован новый раздел Рекомендаций DOQI (Dialysis OutcomeQualityInitiative), названный Рекомендациями по хроническим болезням почек [1]. Появление этого термина стало необходимым, так как в нефрологии сложилась такая ситуация, когда, по сути, развившееся последствие какой-либо патологии почек стало играть роль основного заболевания и потребовало соответствующих лечебных мероприятий. По данным различных исследований, в популяции 10-17% людей имеют признаки ХБП различной степени выраженности. Диагностируется болезнь на ранних стадиях лишь у 1% населения. Так, например, по данным крупного исследования NEORICA, проводимом в Великобритании, среди 40 097 200 обследованных жителей страны в возрасте старше 18 лет, ХБП 3-5-й стадии выявлена у 3 547 654 человек, что составляет 8,8%. В то время как ежегодный прирост диализной ХПН (5 стадия ХБП) составляет 100-150 человек на 1 млн. населения [2]. По данным ряда исследователей, наблюдающийся в настоящее время прогрессивный рост числа пациентов с терминальной ХПН приобретает характер пандемии [3].

В настоящее время в научных публикациях активно дискутируется вопрос о механизме развития и прогрессирования ХБП. Наряду с получившей широкое распространение теорией В.М. Brenner о первостепенной роли в прогрессировании ХБП уменьшения массы действующих нефронов, а также «гипоксической теории» L.C. Fine, в последнее десятилетие стал рассматриваться вопрос о первостепенной роли изменений тубулоинтерстициальной зоны в развитии и прогрессировании ХБП и возникновении терминальной ее стадии. Роль канальцевого эпителия в формировании тубулоинтерстициальных изменений обусловлена несколькими механизмами. С одной стороны, цитокины, продуцируемые клетками, инфильтрирующими почечные клубочки, способны проникать в тубулоинтерстициальное пространство и активировать синтез тубулярными клетками хемокинов, вызывающих, в свою очередь, клеточную воспалительную реакцию в интерстиции [4]. С другой стороны, повышенная продукция цитокинов, секретируемых эпителиальными клетками, непосредственно способствует повреждению клубочков [5]. Кроме того, эпителиальные клетки не только опосредуют интерстициальное воспаление, но также стимулируют секрецию интерстициальными фибробластами таких цитокинов, как тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF-2) и трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ 1). Кроме того, канальцевые эпителиальные клетки принимают участие в синтезе экстрацеллюлярного матрикса как напрямую, так и в результате эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) [6, 7].

В настоящее время эпителиально-мезенхимальная трансформация является новым аспектом реакции почек на повреждение. ЭМТ демонстрирует способность гломерулярных и канальцевых клеток к фенотипическим изменениям в процессе ремоделирования. Эпителий почечных канальцев имеет мезенхимальное происхождение, поэтому он может иметь некоторые общие фенотипические характеристики с фибробластами. Очевидно, что при определенных обстоятельствах фенотипическое сходство канальцевых эпителиоцитов с фибробластами может усиливаться, в связи с чем они начинают экспрессировать ряд экстрацеллюлярных матриксных белков, в т. ч. проколлагены типа I и III, а также фибронектин и ламинин. По мнению ряда авторов, нельзя исключать также и возможность наличия на территории почечного тубулоинтерстиция определенного количества недифференцированных мезенхимальных клеток, которые могут активироваться и непосредственно модулировать фиброгенез [8]. По мнению ряда исследователей, ЭМТ стимулируется группой биологически активных веществ, продуцируемых активированными эпителиоцитами [9]. Такими веществами являются TGF- $\beta$ 1, эпителиальный фактор роста, интерлейкин-1, ангиотензин II, матриксная металлопротеиназа-2 [10]. Так, например, ангиотензин II вызывает фенотипические изменения фибробластов, превращая их в миофибробласты (гладкомышечные актин-позитивные клетки). Пролиферирующие активизированные фибробласты могут занимать перигломерулярные и перитубулярные пространства, способствуя отложению матрикса в тубулоинтерстициальной зоне. При этом присутствие миофибробластов в интерстиции тесно коррелирует с распространенностью тубулоинтерстициального склероза и прогнозом состояния функций почек при различных повреждениях [11]. В процессе ЭМТ канальцевые эпителиальные клетки в ответ на повреждение теряют апикально-базальную полярность, начинают экспрессировать мезенхимальные маркеры, такие как виментин и фибробластно-специфический белок, и снижают экспрессию эпителиальных маркеров: цитокератина, E-кадгерина и др. Потеря функционального E-кадгерина – критическое событие в ЭМТ. Процесс ЭМТ условно подразделяют на 4 составляющих, включающих утрату адгезивных свойств, экспрессию *de novo* альфа-актина гладкомышечными клетками, разрушение базальной мембраны канальцев и собственно нарастающую клеточную трансформацию из эпителиального в мезенхимальный фенотип [12].

Первоначально было установлено, что эпителиальные клетки трансформируются в мезенхимальные в процессе эмбриогенеза. Мезенхимальные клетки имеют две важные в процессе эмбриогенеза характеристики: они могут мигрировать черезвнеклеточный матрикс и дифференцироваться в последующем в другие клетки. ЭМТ в процессе эмбриогенеза имеет название тип 1. Результаты более поздних исследований позволили выявить тип 2, который возникает при прогрессировании фиброза, и тип 3, имеющий место при прогрессии и метастазировании злокачественных новообразований.

В экспериментальных исследованиях установлено, что контакт канальцевых клеток с базальной мембраной оказывает стабилизирующее действие на эпителиальный фенотип. Напротив, разрыв коллагена IV типа – главного компонента тубулярной базальной мембраны – стимулирует эпителиально-мезенхимальную трансформацию [13-15].

Стоит отметить и ряд спорных вопросов, связанных с изучением ЭМТ. Так, Rastaldi и соавт. (2000 г.) провели иммуногистохимическое исследование 133 биопсий с определением эпителиальных маркеров (цитокератины) и маркеров мезенхимальных клеток (виментин,  $\alpha$ -SMA) при разных заболеваниях почек человека, а также с целью доказательства синтеза коллагена эпителиоцитами канальцев почек определяли пролин 4-гидроксилазы, коллаген I и коллаген III типа. Однако результаты исследования не позволили получить достоверные данные, подтверждающие способность клеток продуцировать коллаген, что позволило ряду авторов усомниться в наличии ЭМТ [16]. В своих экспериментальных исследованиях Humphreys B.D. и соавт. определяли экспрессию виментина,  $\alpha$ -SMA эпителиальными клетками канальцев почек при иммуногистохимическом исследовании гистологического материала и *in vitro* в культуре клеток, полученных в различные сроки повреждения почек. Получив отрицательные результаты при гистологическом исследовании, авторы полностью опровергли способность эпителиоцитов трансформироваться в мезенхимальные клетки в естественных условиях [17]. Подобные результаты были получены и в исследованиях других авторов, что подтверждает необходимость дальнейшего изучения данного вопроса [18].

### Материал и методы

В проведенном исследовании мы попытались определить ЭМТ при изучении послеоперационного материала, полученного от 154 больных, находившихся на стационарном лечении по поводу мочекаменной болезни. По результатам определения скорости клубочковой фильтрации все пациенты были разделены согласно последним рекомендациям NKF-K/DOQI (2005) на 5 групп.

Имуногистохимическое исследование проводилось с набором цитокератинов (34 $\beta$ E, 10/13, 5/6 и 8), выявляющих эпителиальные клетки, а также E-кадгеринном.

### Результаты

По результатам определения экспрессии цитокератинов 34 $\beta$ E, 10/13, 5/6 сделать достоверные выводы о снижении уровня экспрессии при прогрессировании ХБП не представлялось возможным. Поскольку и интенсивность экспрессии, и количество экспрессирующих клеток не имело никаких достоверных различий ни в одной из стадий ХБП.

Противоположный результат был получен при исследовании экспрессии цитокератина 8. По всей видимости, только цитокератин 8 специфичен для эпителия почечных канальцев. Однако, согласно авторам теории ЭМТ, ожидалось получение максимального уровня экспрессии на первых двух стадиях и минимального - в последних стадиях ХБП, чего не было в нашем исследовании. Во всех группах наблюдения отмечена ярко выраженная реакция, по результатам подсчета histochemical score соответствующая положительной реакции и определенная нами как +++.

При дальнейшем проведении иммуногистохимического исследования получены достоверные данные, подтверждающие, что при прогрессировании ХБП в эпителиоцитах канальцев почек снижается экспрессия E-кадгерина. Согласно результатам данного исследования, снижение экспрессии происходит постепенно от 2 стадии до отрицательных результатов в 4 и 5 стадиях ХБП, что подтверждено получением статистически значимого уровня  $p=0,021$ , что  $<0,05$ . При этом снижение экспрессии антигена происходило именно в эпителиоцитах, уменьшенных в размерах, приобретающих вытянутую, веретенообразную форму уже со 2 стадии ХБП, что свидетельствовало об исчезновении в них фенотипических признаков эпителиальной ткани. Мы считаем это морфологическим проявлением нарушения нормальной последовательности развития репаративных процессов: пролиферация – дифференцировка.

### Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о нарушении процесса дифференцировки клеток и начале склеротических изменений. Учитывая, что экспрессия цитокератина-8 отмечается как в ранние стадии ХБП, так и в терминальном периоде при массивном фиброзе ткани почек у пациентов 5 стадии ХБП, говорить о приобретении эпителиоцитами фенотипических признаков мезенхимальных клеток не представляется возможным. Таким образом, для подтверждения ЭМТ как фактора прогрессирования фиброза почек при ХБП необходимы дальнейшие исследования с применением широкого спектра иммуногистохимических, морфологических и, возможно, молекулярных методов.

### Литература

1. Земченков А. Ю., Томилина Н. А. К/ДОКИ обращается к истокам хронической почечной недостаточности (о новом разделе Рекомендаций К/ДОQI по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек) // Нефрология и диализ. 2004. Т. 6, № 3. С. 204-220.
2. Chronic kidney disease management in the United Kingdom: NEOERICA project results / P. E. Stevens, D. J. O'Donoghue., S. de Lusignan [et al.] // Kidney Int. 2007. № 72. P. 92-99.
3. Norris K., Vaughn C. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease // Expert. Rev. Cardiovasc. Ther. 2003. Vol. 1, № 1. P. 51-63.
4. Нефрология. Руководство для врачей / под ред. И. Е. Тареевой. М.: Медицина, 2000. 688 с.
5. Команденко М. С., Шостка Г. Д. Основные механизмы развития тубулоинтерстициальных повреждений при болезнях почек // Нефрология. 2000. № 1. С. 10-16.
6. Kairaitis L. K., Harris, D. C. Tubular-interstitial interactions in proteinuric renal diseases // Nephrology. 2001. Vol. 6. P. 198-207.
7. Strutz F., Okada H., Neilson E. G. The role of the tubular epithelial cell in renal fibrogenesis // Clin. Exp. Nephrol. 2001. Vol. 5. P. 62-74.
8. Kuncio G. S., Neilson E. G., Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis // Kidney Int. 1990. № 39. P. 550-556.
9. Strutz F., Neilson E. G. New insights into mechanisms of fibrosis in immune injury // Springer Seminars in Immunopathology. 2003. Vol. 24, № 4. P. 459-476.
10. Cytokines in epithelial-mesenchymal transition: a new insight into obstructive nephropathy / A. H. Bani-Hani, M. T. Campbell, D. R. Meldrum, K. K. Meldrum // J. Urol. 2008. № 180. P. 461-468.
11. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines and myofibroblasts in human membranous nephropathy / S. Mezzano, M. A. Droguett, M. E. Burgos [et al.] // Kidney Int. 2000. № 57. P. 147-158.
12. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: Pathologic significance, molecular mechanisms and therapeutic intervention // J. Am. Soc. Nephrol. 2004. № 25. P. 1-9.
13. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation / F. Strutz, M. Zeisberg, B. Hemmerlein [et al.] // Kidney Int. 2000. № 57. P. 1521-1538.

14. Kairaitis L. K., Harris D. C. Tubular-interstitial interactions in proteinuric renal diseases // *Nephrology*. 2001. Vol. 6. P. 198-207.
15. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis / M. Iwano, D. Plieth, T. M. J. Danoff [et al.] // *Clin. Invest*. 2002. Vol. 110. P. 341-350.
16. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies / M. P. Rastaldi, F. Ferrario, L. Giardino [et al.] // *Kidney Int*. 2002. Vol. 62. P. 137-146.
17. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis / B. D. Humphreys, S. L. Lin, A. Kobayashi [et al.] // *Am. J. Pathol*. 2010. Vol. 176. P. 85-97.
18. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? / W. Kriz, B. Kaissling, M. Le Hir // *J Clin Invest*. 2011. Vol. 121 (2). P. 468-74.