

В.И. Щербаков, Т.И. Рябиченко, Г.А. Скосырева, А.Н. Трунов

Эпителио-мезенхимальный и мезенхимально-эпителиальный переход, патогенез, регуляция, терапия

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», Новосибирск

В обзоре рассмотрены вопросы эпителио-мезенхимального перехода (ЭМП) и его роли при воспалении, фиброзе, опухолевом росте. Проанализированы механизмы и классификация ЭМП. Проведено сравнение различных форм ЭМП. Отмечена важная роль ЭМП в формировании метастаз-иницирующих клеток. Представлены данные о роли фибробластов при фиброзе легких и канцерогенезе. Суммированы стимуляторы и ингибиторы ЭМП. Рассмотрены внутриклеточные пути, связанные с развитием ЭМП под влиянием трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$). Терапия ЭМП связывается с блокированием действия ТФР- $\beta 1$ и является важным направлением в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: эпителио-мезенхимальный переход, фиброз, опухоль, трансформирующий фактор роста $\beta 1$

В настоящее время особое внимание уделяется феномену эпителио-мезенхимального перехода (ЭМП), поднимающего вопрос о терминальной дифференцировке эпителия [30].

ЭМП — это процесс, в ходе которого дифференцированные эпителиальные клетки претерпевают переход в мезенхимальный фенотип [48]. Наиболее полно ЭМП изучен в таких органах как легкие, почки, печень, плацента. В физиологических условиях наблюдается при эмбриогенезе, откуда и пришло это понятие. Относительно же патологических процессов, сопровождающихся этим явлением, можно отметить такие состояния, как развитие опухолей, метастазирование, фиброз легких и почек [2, 3, 5, 6, 8]. Фиброз и рак легких некоторые авторы обозначают как ЭМП-ассоциированные заболевания [25]. ЭМП позволяет по-новому оценить многие заболевания, в том числе эндометриоз [27, 54].

Фенотипически ЭМП проявляется снижением полярности клеток, уменьшением эпителиальных маркеров, включая белки адгезии, реорганизацией цитоскелета, переходом к округло-удлиненной форме. Наряду с этим, по-

являются маркеры мезенхимального фенотипа, включая виментин, альфа-актин гладких мышц, фибробласт-специфический протеин-1, десмин, проколлаген, фибронектин, фактор роста соединительной ткани, N-кадгерин, коллаген 1 типа и инвазивный фенотип. Однако только снижение E-кадгерина является универсальной особенностью ЭМП. Все остальные перечисленные маркеры относятся к группе неспецифических. Например, виментин не является абсолютно специфическим для фибробластных клеток, так как присутствует в лейкоцитах и эндотелиальных клетках. Экспрессия актина гладких мышц-1 ограничена только миофибробластами, представляющими собой активированные фибробласты. Коллаген 1 типа экспрессируется исключительно фибробластами, в то время как фибробласт-специфический протеин-1 нарабатывается воспалительными клетками, сосудистыми гладкомышечными клетками и эндотелием сосудов [47]. В связи с недостаточностью специфичности маркеров рекомендуется использовать панель проб для определения мезенхимального фенотипа в контексте ЭМП.

Механизмы развития эпителио-мезенхимального перехода

Иницирующим триггером ЭМП некоторые авторы считают эпителиальное повреждение/активацию как вирусными, так и химическими агентами [37]. Другие исследователи рассматривают индукцию ЭМП как результат протеолитического разрушения базальной мембраны, на которой расположены эпителиальные клетки, с последующим их повреждением и трансформацией [20]. Эти механизмы были объединены и представлены в виде нескольких критических ступеней для ЭМП [23], см. рис. 1.

1. Разрушение локальной базальной мембраны;
2. Снижение количества эпителиальных клеток;
3. Репрограммирование сигнальной машины и **de novo** синтеза альфа-гладкомышечного актина;
4. Изменение спектра синтезируемых белков.

Комбинация таких цитокинов, как трансформирующий фактор роста бета 1 (ТФР-β1) и фактор роста фибробластов-2 (ФРФ-2), наиболее эффективна в индукции ЭМП. Схожие результаты показаны в отношении сочетания ТФР-β1 и эпидермального фактора роста (ЭФР) [31].

Центральным событием этого перехода является образование транзитной (переходной) клетки, так как в этом состоянии возможен обратный переход от мезенхимального к эпителиальному фенотипу [1, 26]. Данное положение является базовым для будущих терапевтических подходов. Именно на ранних стадиях необходимо терапевтическое воздействие для возвращения трансформированной клетки в эпителиальный фенотип. На более поздних стадиях трансформации обратный ход к эпителиальному фенотипу затруднен или невозможен. На этой стадии лежит граница между физиологическим и патологическим ЭМП. Подтверждением данному положению является снижение активности MEK-1-ERK1/2, обозначаемых как митогенактивируемая протеинкиназа-экстраклеточным сигналом регулируемая киназа 1/2, восстанавливающая эпителиальный фенотип в трансдифференцированных эпителиальных клетках почек [36]. Было обнаружено, что под воздействием дефероксамина (хелатор железа) наблюдается частичный переход фибробластоподобного фенотипа клеток к эпителиальному, то есть мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП) [4].

В качестве примера приводим результаты исследования, которые показали, что фактор роста фибробластов-1 (ФРФ-1) ингибирует ТФР-β1 индуцированный ЭМП на примере альвеолярных эпителиальных клеток. ФРФ-1 осуществлял обратный переход морфологических изменений, индуцированных ТФР-β1 и восстанавливал эпителиальные маркеры до контрольного уровня [34]. Приведенные данные еще раз подтверждают возможность обратного мезенхимально-эпителиального перехода. В отношении альвеолярных эпителиальных клеток также показана возможность того, что они могут быть источником легочных миофибробластов [37]. Это свидетельствует о том, что эпителио-мезенхимальный переход является одним из механизмов в патогенезе идиопатического фиброза легких фатального заболевания с неясной этиологией и неизвестным патогенезом.

В качестве дополнительного доказательства можно привести данные, которые показали *in vitro*, что ТФР-β1 индуцирует ЭМП в альвеолярных эпителиальных клетках [46]. Важно и то, что клетки на переходной стадии коэкспрессируют как эпителиальные, так и мезенхимальные маркеры, что подтверждает наличие ЭМП *in vivo* при таком заболевании, как идиопати-

ческий фиброз легких. Прямая роль ТФР-бета в ЭМП показана *in vivo* в легких [22]. Авторы обнаружили, что при идиопатическом фиброзе легких в биопсийном материале альвеолярные эпителиальные клетки (АЭК) демонстрировали черты раннего ЭМП. Сверхэкспрессия активного трансформирующего фактора роста-бета в эксперименте доказала наличие ЭМП *in situ*. Этот процесс зависел от экстраклеточного матрикса. Так фибронектин и фибрин побуждал АЭК к ЭМП через интегрин-зависимую активацию латентного ТФР-β1. В противоположность этому клетки, культивируемые на ламинин/коллагеновой основе, не активировали ТФР-β1 сигнальный путь, ведущий к ЭМП. Оказалось, что при экспозиции АЭК с активным ТФР-β1 запускался преимущественно апоптоз. В дискуссии авторы отмечают, что фибробласты, получаемые в ходе ЭМП, уникальны по своему экспрессируемому профилю и могут отличаться от других фибробластов. В качестве доказательства приводятся предварительные наблюдения, указывающие на то, что фибробласты, происходящие из эпителиальных клеток при ЭМП, более склонны к гибели в культуре, чем резидентные фибробласты легких. Авторы предположили, что эти фибробласты могут супрессировать прогрессирование фиброза. Было также показано, что ЭМП вовлечен в развитие фиброза печени на модели индуцируемой четыреххлористым углеродом [56].

К настоящему времени установлено, что миофибробласты при фиброзе легких имеют несколько источников происхождения — из фибробластов, фиброцитов и эпителиальных клеток (рис. 2).

Аналогичная схема происхождения фибробластов была представлена при фиброзе почек [20]. Показано, что примерно 14-15% фибробластов имеют костно-мозговое происхождение, 36% происходит из эпителиальных клеток почек через локальный ЭМП, остальные — за счет пролиферации фибробластов из других источников. Отмечены следующие особенности происхождения фибробластов при фиброзе легких — резидентные 60-80%, 10-15% за счет ЭМП, 10% костномозговые фибробласты и 15-25% фиброциты костно-мозгового происхождения [23]. Доказано, что при фиброзе печени 45% фибробластов происходят из гепатоцитов через ЭМП [56].

Миофибробласты, представленные на рис. 2, обладают уникальной способностью активации ТФР-β1 — центральной молекулы ЭМП, находящегося в латентном состоянии в соединении с экстраклеточным матриксом [48, 49]. Перевод ТФР-β1 из латентного в активное состояние связан с сокращением миофибробластов, что обеспечивается по крайней мере тремя механизмами:

1. Высокой контрактильной активностью.
2. Передачей сигнала через интегрины на латентно-ассоциированный пептид-ТФР-β1.
3. Интеграцией большого латентного комплекса в механо-резистентный ЭКМ.

Высокая контрактильная активность, генерируемая альфа-гладкомышечным актином, передается в место связывания интегрин с RGD, объединенного с латентно ассоциированным пептидом, как часть большого латентного комплекса, в который входят ТФР-β1 и латентный ТФР-β связывающий протеин. Большой латентный комплекс присоединен к внеклеточному матриксу (ВКМ). Клеточно-обусловленный стресс способен индуцировать структурные изменения в латентном ТФР-β, связывающем протеин, и/или конформацию латентно-ассоциированного протеина, ведущего к освобождению ТФР-β1. Он может связываться со своим рецептором, присутствующим на миофибробластах, стимулируя эти клетки.

На экспериментальной модели фиброза почек показано, что рекомбинантный человеческий белок костного морфогенеза-7 (БКМ-7), как эндогенный антагонист ТФР-β1, оказывает терапевтическое действие, снижая количество фибробластов за счет торможения ЭМП и, возможно, фибробластов, происходящих из костного мозга и, как результат этого, ослабление фиброза [55]. Авторы также показали, что на фоне торможения ЭМП происходит снижение секреции коллагена I типа, и, что самое главное, БКМ-7 способен индуцировать мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), облегчая регенерацию поврежденных почек. Они также отмечают, что в эмбриогенезе ЭМП и МЭП представляют собой механизм развития многоклеточных организмов. Отмечается также, что традиционно эпителиальные клетки взрослого организма считались терминально-дифференцированными. Работы последних лет показали, что зрелые эпителиальные клетки почек, легкого, глаза, перитонеума, кишечника способны к ЭМП при хронических воспалительных заболеваниях, связанных с фиброзом. Доказано, что ЭМП связан также с канцерогенезом [13].

Исследуя другие возможные механизмы благоприятного действия белка костного морфогенеза (БКМ), на примере БКМ-2 показано, что он противостоит почечному интерстициальному фиброзу за счет усиления катаболизма рецептора I типа для ТФР-β [52, 53]. Авторы отмечают, что эффект от БКМ-2 схож с таковым от БКМ-7. Другой возможный механизм связан с гремлином-ингибитором протеинов костного морфогенеза. Гремлин, соединяясь с БКМ-2,4 и 7, ингибирует их связывание с рецепторами клеточной поверхности. Доказано, что фи-

бробласты при идиопатическом фиброзе легких сверхэкспрессируют гремлин [24]. Наряду с этим внутриклеточный сигнальный путь от БКМ-4 резко ослабляется в фибробластах при идиопатическом фиброзе легких. ТФР-бета индуцирует экспрессию гремлина в связи с ЭМП в эпителиальных клетках легких, повышая чувствительность эпителиальных клеток к ТФР-β1, индуцируемому ЭМП. Представлена схема взаимодействия ТФР-β, БКМ-4 и гремлина (рис. 3).

Экспрессия ТФР-β индуцируется на ранних стадиях идиопатического фиброза легких (ИФЛ.). ТФР-β рекрутирует фибробласты в места повреждения и вызывает их активацию, а также стимулирует ЭМП альвеолярных эпителиальных клеток. Легочные миофибробласты, персистирующие при ИФЛ, сверхэкспрессируют гремлин, который ингибирует регенерацию эпителия, индуцированную БКМ-4. Эти механизмы поддерживают повреждение эпителия и активируют ТФР-β1. Параллельно гремлин блокирует БКМ-4, обусловленный апоптоз миофибробластов, препятствуя снижению количества миофибробластов: то есть, разобщается контур, контролирующий количество коллаген-продуцирующих клеток, ведущее в конечном итоге к интенсивному накоплению внеклеточного матрикса. Отмечено, что активированный миофибробласт способен синтезировать в сутки 3,5 миллиона молекул коллагена [11]. Вышеописанный механизм, действующий при фиброзе, вероятно, при опухолях развивается по иному сюжету, где в место повреждения мигрируют в основном лимфоциты и макрофаги (так называемые опухолеассоциированные лимфоциты и макрофаги), хотя и фибробласты также играют важную роль при этом процессе. Другими словами, можно описать формально формулу цирроза и опухолевого процесса с позиций ЭМП. Цирроз — это ЭМП плюс различные формы фибробластов, в то время как опухоль — ЭМП плюс лимфоциты, макрофаги в меньшей степени фибробласты. За этими событиями стоят различные хемоаттрактанты, привлекающие либо фибробласты, либо моноциты и макрофаги. Можно предположить, что введение хемоаттрактантов для специфической субпопуляции фибробластов при опухолевом процессе, может являться терапевтической процедурой для лечения опухолей.

ЭМП и канцерогенез

В настоящее время доказана роль ЭМП и МЭП при канцерогенезе [13, 18]. Также, как и при фиброзе, важную роль при опухолевом росте играют так называемые опухоле-ассоциированные фибробласты (ОАФ). Сравнение их функционирования полезно для понимания хода

опухолевого процесса. Доказано участие ОАФ в опухолевом росте, пролиферации, ремоделировании ВКМ, формировании метастазов, ангиогенезе, регуляции давления в опухолях, инвазии опухолевых клеток, избегании иммунного контроля, адгезии клеток к ВКМ, тканевом ремоделировании, иммуносупрессии [38, 44] ОАФ за счет секреции гормонов, хемокинов и цитокинов, которые способны обеспечивать резистентность опухолей к химиотерапии. Отмечено, что, фактор роста гепатоцитов (ФРГ), секретируемый ОАФ, защищает опухолевые клетки от химиотерапевтических агентов за счет повышения репарации ДНК и отрицательной регуляции экспрессии антиапоптотического белка, такого как BCL-XL [14]. ФБ при фиброзе и опухолевом росте функционально во многом отличаются друг от друга, в основном за счет расширения спектра функции при опухолевом росте. Также отметим одну из особенностей формирования внеклеточного матрикса (ВКМ) при опухолевом росте: протеины ВКМ секретируются не только ОАФ, но и опухолевыми клетками (тенасцин, секретируется опухолевыми клетками, а периостин — ОАФ). Эти белки ВКМ способствуют формированию метастатических ниш, поддерживая самовозобновление метастаз-иницирующих клеток (МИК), индуцируя Notch и WNT сигналы соответственно. К настоящему времени можно считать, что ОАФ обладают функцией, усиливающей метастазирование [21]. Важную роль БКМ-4 играет при фиброзе, но этот белок значим и при опухолевом росте, где он супрессирует метастазы, блокируя Г-КСФ индуцированную экспансию супрессорных клеток миелоидного происхождения [9].

В последние годы появились классификации ЭМП [32]. Выделяются 3 типа:

1 тип ЭМП связан с физиологическими процессами, вовлеченными в образование органов и тканей в эмбриогенезе.

2 тип ЭМП связан с тканевым фиброзом при хронических воспалительных заболеваниях, что показано для почек, легких, печени, кишечника.

3 тип ЭМП является важным механизмом в развитии опухолевого процесса и такими его свойствами, как миграция, инвазивность.

В связи с этой классификацией возникает вопрос, почему при одном виде ЭМП эпителиальная клетка трансформируется в фибробласт, а при другом — в опухолевую клетку. От решения этого вопроса во многом зависит лечение не только циррозов, но и опухолевого процесса.

Сравнение этих форм ЭМП важно для понимания развития различной патологии, в том числе и опухолевого процесса. Показано принципиальное отличие между миграцией клеток в эмбриональном состоянии и при опухолевом

росте [10]. В первом случае миграция осуществляется пластом клеток (коллективная миграция) [35]. В то время как при опухолевом процессе миграция осуществляется единичными клетками, т.е. другими словами, в опухолевой ткани нарушаются связи клеток не только с базальной мембраной, но и межклеточные связи. Таким образом, клетка получает возможность мигрировать в кровеносные и лимфатические сосуды.

С этих позиций эмбриональный ЭМП является запрограммированным процессом, а опухолевый ЭМП выполняет задачу адаптации клеток к воздействию того или иного неблагоприятного фактора (вирусного, химического и т.д.). С позиций адаптации наиболее близки второй и третий типы ЭМП, хотя молекулярные события, ведущие к исходу того или иного ЭМП не понятны.

В настоящее время нет полного понимания роли ЭМП при опухолевом росте. Однако, ЭМП играет критическую роль в опухолевом метастазировании-ключевом событии опухолевого процесса [10]. Авторы отмечают несколько моментов, относящихся к этому сюжету: во-первых, клетки микрометастазов имеют повышенную экспрессию ЭМП генов (генов, ответственных за ЭМП), во-вторых ЭМП важен для формирования метастазов, а МЭП — для роста опухолей. Остается непонятным, какую роль ЭМП и МЭП играют в формировании метастаз-иницирующих клеток. В данной статье авторы оперируют такими понятиями, как «гибридные состояния», гибриды ЭМП/ МЭП состояние, при котором клетки имеют как эпителиальные, так и мезенхимальные признаки. Так, мезенхимально-подобные раковые стволовые клетки, имеющие фенотип CD24-CD44+, имеют высокую инвазивную способность, в то время как эпителиально-подобные раковые стволовые клетки имеют высокие пролиферативные способности, но менее инвазивны. Авторы предполагают, что гибридное состояние создает высокую степень пластичности для опухолевых клеток, позволяя адаптироваться им к неблагоприятным условиям. Частичные переходы — первый ЭМП и затем МЭП требуется для развития раковых стволовых клеток и их переходу в метастаз-иницирующие клетки. Флюктуация ЭМП/МЭП облегчает избегание от иммунного контроля при метастазировании. ТФР β, секретируемый опухолевыми клетками, способен угнетать продукцию цитолитических и протеолитических факторов CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов [43]. Эти данные показывают, что при втором и третьем вариантах ЭМП действуют те же факторы, но функции их отличаются. Они также отмечают важную деталь в отношении ЭМП, а именно существование различных программ

ЭМП в различных клеточных популяциях, что предполагает значительную гетерогенность самого понятия ЭМП,

Регуляторы эпителио-мезенхимального перехода

Таким образом, многие известные молекулы при определенных условиях участвуют в процессе ЭМП, при этом одни являются стимуляторами, а другие ингибируют процесс, что представлено в табл. 1, причем, этот список постоянно пополняется.

Таблица 1. Стимуляторы и ингибиторы эпителио-мезенхимального перехода

Стимуляторы	Ингибиторы
Трансформирующий фактор роста $\beta 1$	Фактор роста гепатоцитов
Эпидермальный фактор роста	Белки костного морфогенеза – 2,4,7.
Фактор роста фибробластов-2	Простагландин E2
Фактор роста соединительной ткани	Коллаген 1V типа
Матриксные металлопротеиназы-2,9	Витамин Д
Интерлейкин-1	NO
Ангиотензин-11	N-ацетилцистеин
Коллаген 1 типа	Эритропоэтин
Эндотелин-1	Фактор роста фибробластов -1
Высокий уровень глюкозы	
$\beta 6$ -интегрин	
Циклоспорин А	
Паратиреоидный гормон связанный протеин	
Альдостерон	
Фибронектин	

При всем многообразии регулирующих молекул следует четко понимать ведущую роль в индукции ЭМП-трансформирующего фактора роста $\beta 1$. Экстраординарная способность этого цитокина в индукции ЭМП общепризнана. Его сигнальный путь является главным путем, ведущим к интерстициальному фиброзу при различных патологических условиях. Другие факторы, такие как эпидермальный фактор роста и фактор роста фибробластов-2, обладают в меньшей степени способностью к индукции ЭМП, но способны оказывать синергический эффект с ТФР- $\beta 1$, усиливая ЭМП. Другие факторы, участвующие в ЭМП, могут регулировать его через модуляцию экспрессии или активности ТФР- $\beta 1$. Такие факторы, как интерлейкин-1, матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2), ангиотензин 11 — центральный компонент ренин-ангиотензиновой системы (РАС) усиливают действие ТФР- $\beta 1$ в индукции ЭМП в тубулярных эпителиальных клетках почек [28]. Эффект этих медиаторов обеспечивается путем протеолитической деградациии базальной мембраны, осно-

ву которой составляет коллаген 1V типа [12]. Компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген 1 типа, усиливают ЭМП [41]. Культивирование тубулярных эпителиальных клеток на коллагене 1 типа обеспечивает трансдифференцировку этих клеток, в то время как коллаген 1V типа стабилизирует эпителиальный фенотип.

Оксид азота ослабляет ЭМП альвеолярных эпителиальных клеток через такие механизмы, как торможение экспрессии коллагена 1 типа в ТФР- $\beta 1$ обработанных клетках, защищая эпителиальную морфологию клеток, и, вероятно, самый главный механизм-ингибирования апоптоза эпителиальных клеток индуцированного ТФР- $\beta 1$ [45]. N-ацетилцистеин тормозит ТФР- $\beta 1$ индуцированный в альвеолярных эпителиальных клетках ЭМП за счет снижения генерации активных форм кислорода [15]. Однако по данным этих авторов сам H_2O_2 не индуцировал ЭМП. Таким образом, в процессе ЭМП задействован окислительно/нитративный стресс.

Фактор роста гепатоцитов тормозит переход эпителия в миофибробласты путем положительной регуляции экспрессии Smad7 в эпителиальных клетках легких, ингибируя тем самым генерацию фибробластного фенотипа [40]. Макрофагальная матриксная металлопротеиназа (ММП-9) обуславливает ЭМП в почечных тубулярных эпителиальных клетках [42]. Ингибирование ММП-9 тормозит ЭМП. Авторы отмечают, что индуцированный ММП-9 ЭМП похож на таковой индуцированный ТФР- β .

Простагландин E2 (ПГЕ2) блокирует ЭМП индуцированный ТФР- $\beta 1$, что связывается со значительным повышением внутриклеточного цАМФ и блокадой окислительного стресса, индуцированного ТФР- $\beta 1$ [57]. Агенты, стимулирующие подъем цАМФ, например, форсколин, также ингибируют ЭМП. Этой же группой авторов в более поздней работе показано, что альдостерон способен индуцировать ЭМП через механизм, связанный с активными формами кислорода митохондриального происхождения [58]. Эритропоэтин также ослабляет ЭМП, ингибируя ТФР- β [33]. Авторы делают вывод, что ренопротективный эффект рекомбинантного эритропоэтина человека может быть обусловлен частичным ингибированием ТФР- β индуцированного ЭМП [20].

Паратиреоидный гормон-связанный протеин, также усиливает ЭМП за счет кооперации с ТФР- $\beta 1$, эпидермальным фактором роста и сосудисто-эндотелиальным фактором роста [7].

Ингибиторы ЭМП в различных сочетаниях могут рассматриваться как потенциальные противоопухолевые препараты за счет торможения ЭМП и препятствования переходу трансформированных клеток в истинно опухолевые клетки.

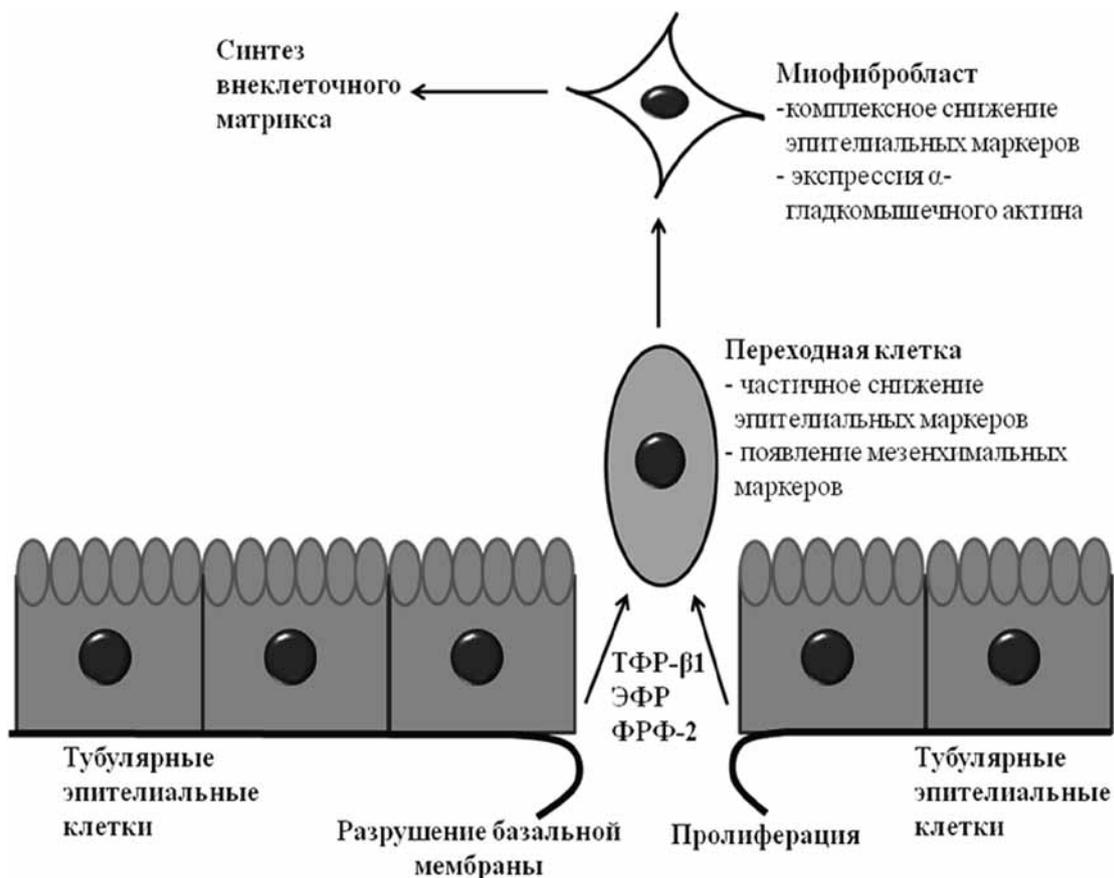


Рис.1. Возможный механизм вовлечения в процесс перехода тубулярного эпителия в миофибробласты через переходный клеточный тип

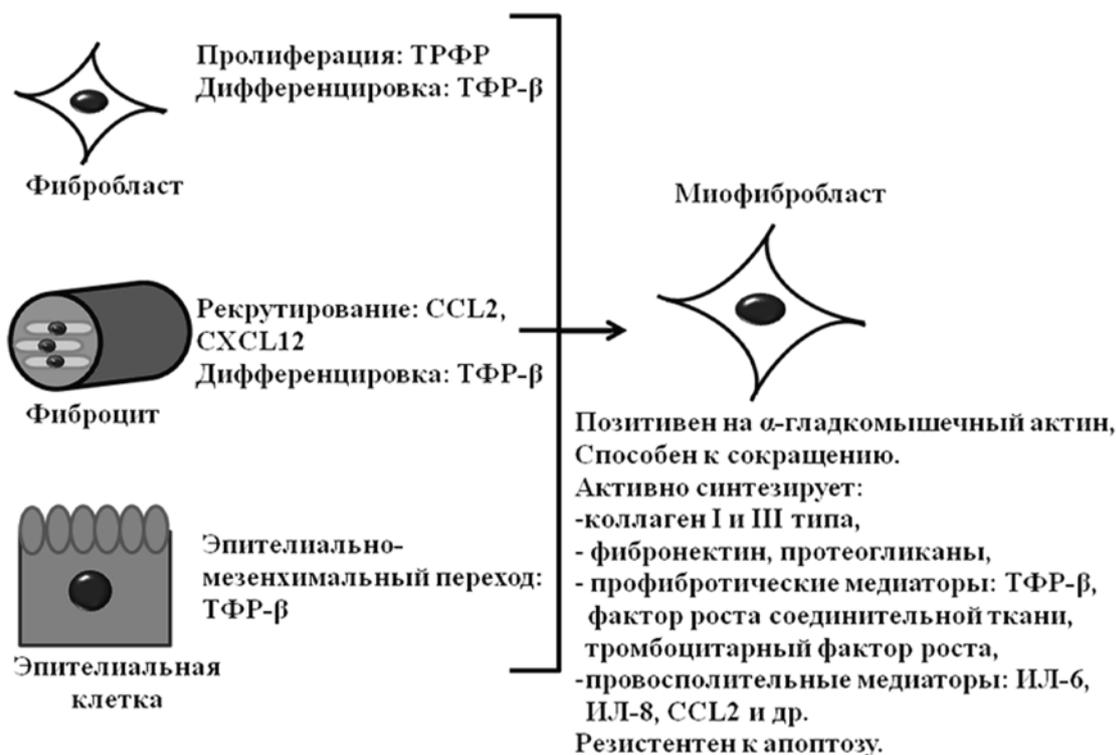


Рис. 2. Происхождение миофибробластов при фиброзе легких [11]

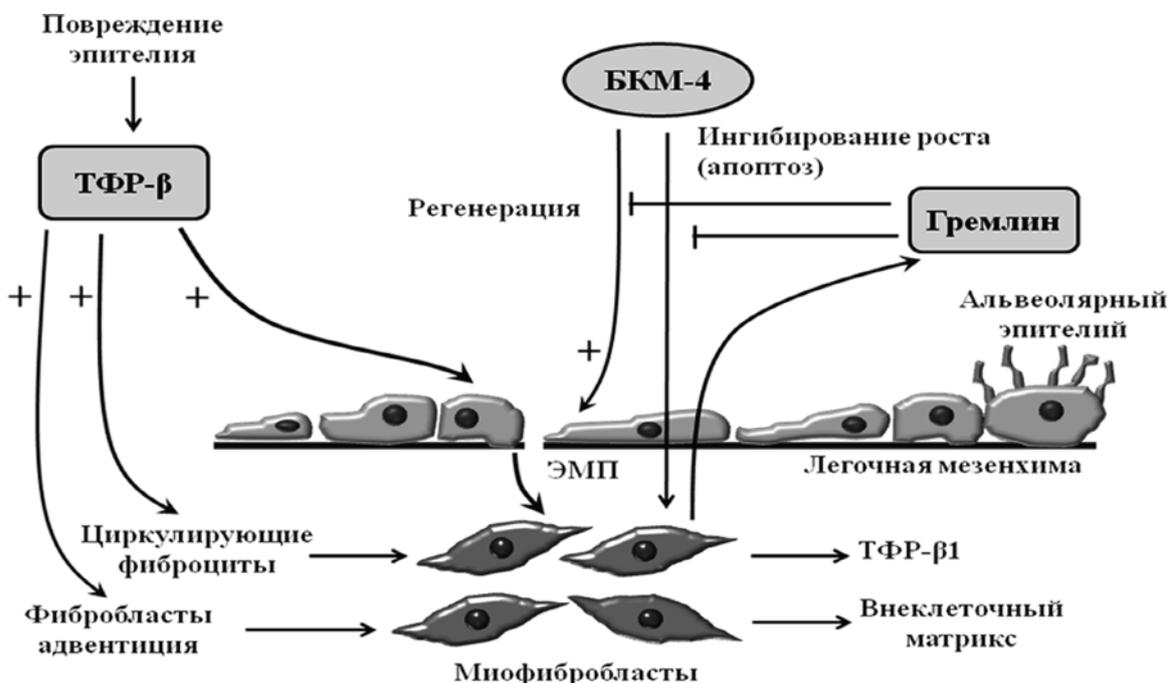


Рис. 3. Возможная роль сигнальных путей ТФР-β и БKM-4 при ИФЛ

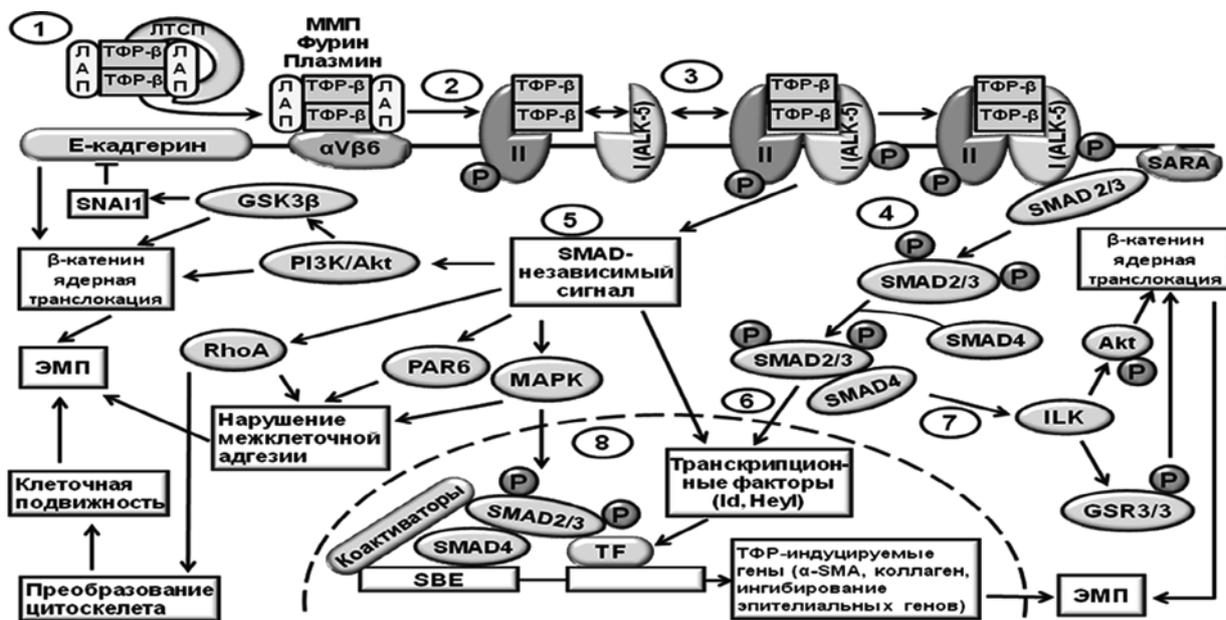


Рис. 4. Пути, вовлеченные в ТФР-β1 — обусловленный ЭМП

ЛАП-латентно-ассоциированный пептид, ЛТСП-латентный ТФР-β связывающий протеин, MMP-матриксная металлопротеиназа, ALK-5-рецептор для ТФР-β типа 1. Smad-композит из Sma (Caenorhabditis elegans) и Mad (Drosophila melanogaster). SBE-Smad связывающий элемент. ILK-интегрин связанная киназа. GSK-гликоген синтаза киназа 3. SARA — Smad якорь для активации рецептора. MAPK-митоген – активированная протеин киназа. Rho A — Ras гомолог. PAR6 — полярный протеин. PI3K – фосфатидилинозитол-3киназа. SNAI – 1-транскрипционный репрессор. Akt — протеин киназа B

Внутриклеточные пути развития ЭМП

Рассматривая эпителио-мезенхимальный переход, нельзя обойти внутриклеточные пути, обуславливающие этот процесс. На рис. 4 представлены основные пути, ведущие к индукции ЭМП, на примере классического индуктора ЭМП- ТФР-β1 [48].

ЭМП может быть вызван различными стимулами, индуцирующими воспаление и опухолевые

процессы. Однако ТФР-β является мастером переключения этого процесса [48]. Основная масса ТФР-β присутствует во внеклеточном окружении в латентной форме, находясь в неактивном состоянии с латентно-ассоциированным пептидом и соединена с латентным ТФР-β связывающим протеином [39]. После освобождения ТФР связывающего протеина ТФР, связанный с латентно-ассоциированным пептидом, освобождается через протеолизис различными энзима-

ми, например, плазмином, или стабилизируется мембраносвязанными интегринными, такими, как $\alpha V\beta 6$ и презентуется к ТФР-рецепторам. ТФР- β димеры связываются с рецептором для ТФР- β типа 2 и затем соединяются с рецепторами для ТФР- β типа 1, образуя гетеродимер. Рецепторный гетеродимер активирует различные сигнальные пути и, как результат этого, активируются транскрипционный и негеномный сигналы, куда вовлекаются Smad — обусловленный и независимый от Smad пути.

Smad-обусловленный путь ведет к активации ТФР- β . Вместе с этим ингибируются эпителиальные гены-Е-кадгерина, через активацию/индукцию и совместную ассоциацию с различными транскрипционными факторами (включая Snail 1, Snail2, Notch и другие) с последующим связыванием со Smad-связывающими элементами. Smad- обусловленный сигнал также может активировать негеномные сигнальные молекулы, такие как ИЛК-интегрин –связанную киназу, которая ведет к активации Akt и GSK3B и ядерной транслокации β -катенина, необходимой для ЭМП.

НеSmad обусловленные пути многочисленны и включают активацию PI3K/Akt, RhoA, PAR6 и MAPK, ведущие к многим клеточным изменениям, включая нарушение межклеточной адгезии, преобразование цитоскелета, отрицательную регуляцию Е-кадгерина, ядерную транслокацию β -катенина и затем ЭМП. В заключение следует отметить, что неSmad обусловленный сигнальный путь может взаимодействовать со Smad-обусловленным геномным сигналом через модуляцию и активацию транскрипционных факторов (например, через MAPK).

Итак, на основании вышеприведенных данных выделяется два пути: Smad-зависимый и Smad- независимый сигнал в ЭМП. Отмечено, что эпителио-мезенхимальный переход в ответ на ТФР- $\beta 1$ и последующий фиброз осуществляются в основном через Smad-зависимый (главным образом Smad3) путь. В Smad- обусловленном пути, ТФР- $\beta 1$ сигнал передается через трансмембранные рецепторы типа 1 и 11. При ТФР- $\beta 1$ стимуляции рецепторы интернализуются для образования комплекса Smad2/3 [48]. Фосфорилирование этого комплекса ведет к присоединению к нему Smad 4 и транслокации его в ядро, взаимодействию с другими транскрипционными факторами, регулируя транскрипционные гены, отвечающие на ТФР- β (включая фактор роста соединительной ткани, α -гладкомышечный актин, коллаген1 и ингибитор-1 активатора плазминогена), и взаимодействуя с Smad-связывающими элементами.

Smad-независимый путь при ТФР- β индуцированном ЭМП включает RhoA, MAPK, PI3 киназу, полярный протеин (Par6), обеспечиваю-

щих различные изменения в клетках ведущие к ЭМП (рис. 4). Например, снижение адгезии эпителиальных клеток усиливает ЭМП, что является общепризнанным фактом. ТФР- $\beta 1$ быстро супрессирует экспрессию Е-кадгерина в культивируемых эпителиальных клетках почек, что является одним из главных событий, характеризующих ЭМП [50].

Рассматривая ЭМП, индуцированный ТФР- β , нужно отметить способность этого цитокина усиливать инактивацию внеклеточных тиреоидных гормонов через стимуляцию тип 3 иодотирониндеиодиназы (Д3) [17]. Авторы показали, что все три изоформы ТФР- β индуцируют эндогенную активность Д3 в легочных фибробластах. Активность Д3 в легочных фибробластах повышается в 31 раз при стимуляции ТФР- $\beta 1$ и эта стимуляция осуществляется через Smad-зависимый путь, формируя острый локальный гипотиреозидизм. В обсуждении авторы обосновывают биологическую значимость локального гипотиреозидизма, индуцированного ТФР- β , указывая, что это состояние облегчает экспрессию онкофетальных генов, ингибируя дифференцирующий эффект тиреоидных гормонов или усиливая выживание нормальных клеток при ишемии /воспалении и редуцируя их метаболические требования. Возможно, что локальная инактивация тиреоидных гормонов может быть важным механизмом эффектов, генерируемых ТФР- β , в том числе и ЭМП. В качестве косвенного доказательства приводятся данные, указывающие на то, что Д3 в утероплацентарной единице инактивирует 80% тиреоидных гормонов, контролируя перенос материнских тиреоидных гормонов к плоду, осуществляя тем самым локальный контроль этих гормонов в эмбриональных тканях, где ЭМП представлен наиболее полно [16].

Терапия эпителио-мезенхимального перехода

Приведенные в статье данные свидетельствуют о том, что ЭМП может быть заторможен или даже осуществлен обратный мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП). Эти данные могут являться основой для терапии ЭМП, а, в конечном итоге, связанной с ним такой патологии, как опухоли и цирроз. Следует четко понимать, что ЭМП обратим по крайней мере на ранней стадии [28]. В качестве вероятных терапевтических подходов возможно использование фактора роста гепатоцитов и белков костного морфогенеза. Фактор роста гепатоцитов (ФРГ) способен блокировать ЭМП, индуцированный ТФР- $\beta 1$, восстанавливая эпителиальный Е-кадгерин и супрессируя такие мезенхимальные маркеры, как α -гладкомышечный актин, виментин, фибронектин. Введение ФРГ эффективно блокирует

ЭМП *in vivo* и ослабляет почечный интерстициальный фиброз при обструктивной нефропатии [52]. Использование экзогенного белка костного морфогенеза-7 (БКМ-7) ослабляет развитие почечного фиброза и улучшает почечные функции за счет торможения ЭМП [29]. Положительный эффект БКМ-7 показан также на модели диабетической нефропатии [46].

Рекомбинантный БКМ-7 человека, ингибируя ЭМП, ослабляет фиброз печени при введении четыреххлористого углерода [56]. Авторы показали, что БКМ-7 блокирует ТФР- β 1 индуцированный ЭМП в системе *in vitro*, когда гепатоциты инкубировались при совместном воздействии ТФР- β 1 и БКМ-7. Оценивая терапевтический эффект рекомбинантного человеческого БКМ-7 (рчБКМ-7) *in vivo* на модели СС14-индуцированного фиброза печени, авторы предложили две схемы: 1) схема до введения и 2) схема через две недели от начала введения этого гепатотропного токсина, когда уже появлялось фибротическое повреждение печени. Показано, что фибротических повреждений было значительно меньше при лечении, чем в контрольной группе. Все это сочеталось с улучшением функций печени, оцениваемой по уровню сывороточного альбумина. На основании полученных результатов авторы делают вывод, что ингибирование ЭМП рчБКМ-7 ведет к ослаблению фиброза печени и улучшает функцию печени, а рчБКМ-7 может рассматриваться, как терапевтический агент для контроля фиброза печени.

Учитывая, что ЭМП является многоступенчатым процессом (рис. 4), можно предполагать, что комбинация двух или более терапевтических стратегий окажется более эффективна, что и было показано при комбинировании ФРГ и ингибитора ангиотензина II. Предполагается, что специфические ингибиторы фосфодиэстеразы 4 могут быть использованы для терапии ЭМП-связанных заболеваний, таких как фиброз и рак легких [25, 51]. NO, тормозящий ЭМП, может быть использован для предотвращения или лечения интерстициальных болезней легких, таких как идиопатический фиброз и бронхолегочная дисплазия [45]. Полагают, что, воздействие на эндотелин-1, который индуцирует альвеолярный эпителио-мезенхимальный переход, также может рассматриваться в качестве нового подхода в лечении идиопатического фиброза легких [19].

При опухолевом росте в связи с высокой пластичностью опухолевых клеток возможна комбинированная блокада ЭМП и МЭП. Блокада ЭМП будет способствовать торможению развития химиорезистентности и инвазии, а торможение МЭП — снижению пролиферативной активности опухолевых клеток. Вполне

вероятно, что именно при таком подходе возможно блокирование пролиферативной активности, ведущей к усилению метастазирования. С другой стороны, торможение ЭМП/МЭП снизит пластичность опухолевых клеток, повышая эффективность противоопухолевой терапии.

Таким образом, появляется возможность разработки новых технологий для лечения таких грозных и пока неизлечимых заболеваний как фиброз и опухоли легких, почек, печени на основе воздействия на феномен эпителио-мезенхимального перехода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киясов А.П., Гумерова А.А., Титова М.А. Мезенхимально-эпителиальная трансформация клеток Ито *in vitro* // Клеточ.технол.в биол.и мед. – 2006. – № 3. – С. 150-153.
2. Лазаревич Н.Л. Эпителиально-мезенхимальный переход при прогрессии гепатокарцином // Вестник онкол. науч.центра РАМН. – 2003. – № 3. – С. 76-82.
3. Пучинская М.В. Раковые стволовые клетки, как возможный источник возникновения и прогрессирования опухолей // Вопр.онкол. – 2016. – Т. 62. – № 1. – С. 14-23.
4. Рубцова С.Н., Васильев Ю.М. Хелатор железа дефероксамин индуцирует эпителиальную трансформацию опухолевых клеток // Докл. РАН. – 2006. – Т. 411. – № 4. – С. 555-557.
5. Спирина Л.В., Кондакова И.В. Миграция клеток и онкогенез // Росс.онкол.ж-л. –2010. – № 3. – С. 49-53.
6. Щербakov В.И., Рябиченко Т.И., Скосырева Г.А. Идиопатический фиброз легких и апоптотический парадокс // Вестник НГУ, серия биол. клин.мед. – 2011. – Т. 9. – Вып. 3. – С. 219-226.
7. Ardura J.A., Rayego-Mateos S., Ramila D. et al. Parathyroid hormone-related protein promotes epithelial-mesenchymal transition // JASN. – 2010. – Vol. 21. – № 2. – P. 273-248.
8. Beirne S.L., Walsh S.M., Fabre A. et al. CXCL 9 Regulates TGF- β -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in human Alveolar Epithelial Cells // J. Immunol. – 2015. – Vol. 195. – № 6. – P. 2788-2796.
9. Cao Y., Slaney C.Y., Bidwell B.N. BMP4 inhibits breast cancer metastasis by blocking myeloid-derived suppressor cell activity // Cancer Res. – 2014. – Vol. 74. – № 18. – P. 5091-5102.
10. Celia-Terrassa T., Kang Y. Distinctive properties of metastasis – initiating cells // Genes.dev. – 2016. – Vol. 30. – № 20. – P. 892-908.
11. Chambers R.C. Abnormal wound healing responses in pulmonary fibrosis: focus on coagulation signaling // Eur. Respir. Rev. – 2008. – Vol. 17. – № 109. – P. 130-137.
12. Cheng S., Lovett D.H. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation // Am. J. Pathol. – 2003. – Vol. 162. – P. 1937-1949.
13. Ding W., You H., Dang H. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of murine liver tumor cells promotes invasion // Hepatology. – 2010. – Vol. 52. – № 3. – P. 945-953.
14. Fan S., Wang J.A., Yuan R.O. et al. Scatter factor protects epithelial and carcinoma cells against apoptosis induced

- by DNA-damaging agents // *Oncogene*. – 1998. – Vol. 17. – № 2. – P. 131-141.
15. Felton V.M., Borok Z., Willis B.C. N-acetylcystein inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition // *AJP Lung Cell Mol Physiol*. – 2009. – Vol. 297. – № 1. – P. 805-812.
 16. Huang S.A., Dorfman D.M., Genest D.R. et al. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium // *J.Clin.Endocrinol.Metab*. – 2003. – Vol. 88. – № 3. – P. 1384-1388.
 17. Huang S.A., Mulcahey M.A., Crescenzi A. et al. Transforming growth factor- β promotes inactivation of extracellular thyroid hormones via transcriptional stimulation of type 3 iodothyronine deiodinase // *Mol.Endocrinol*. – 2005. – Vol. 19. – № 12. – P. 3126-3136.
 18. Huang Y., Fernandez S.V. Goodwin S.at.al. Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Breast Epithelial Cell Transformed by 17 β - Estradiol // *Cancer Res*. – 2007. – № 23. – P. 11147-11155.
 19. Jain R., Shaul P.W., Borok Z., Willis B.C. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF- β 1 // *Amer.J.Respirat.Cell Mol.Biol*. – 2007. – Vol. 37. – № 1. – P. 38-47.
 20. Kalluri R., Neilson E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implication for fibrosis // *J.Clin.Invest*. – 2003. – Vol. 112. – № 12. – P. 1776-1784.
 21. Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblast in cancer // *Nat. Rev. Cancer*. – 2006. – Vol. 6. – № 5. – P. 392-401.
 22. Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J., et al Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix // *PNAS*. – 2006. – Vol. 103. – № 35. – P. 13180-13185.
 23. Kisseleva T., Brenner D.A. Mechanisms of fibrogenesis // *Exp.Biol.Med*. – 2008. –Vol. 233. – № 2. – P. 109-122.
 24. Koli K., Myllarniemi M., Vuorinen K. et al. Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am.J.Pathol*. – 2006. – Vol. 169. – № 1. – P. 61-71.
 25. Kolosionek E., Savai R., Ghofrani H.A. et. al. Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: the role of phosphodiesterase 4 // *MBoC*. – 2009. – Vol. 20. – № 22. – P. 4751-4765.
 26. Li M., Luan F., Zhao Y., Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis // *Exp.biol.Med*. – 2016. – Vol. 241. – № 1. – P. 1-13.
 27. Liao C-J, Li P-T, Lee Y-C. et al. Lipocalin 2 induces the epithelial –mesenchymal transition in stressed endometrial. – 2001. – Vol. 147. – № 2. – P. 179-187.
 28. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis:pathologic significance, molecular mechanism and therapeutic intervention // *JASN*. – 2004. – Vol. 15. – № 1. – P. 1-12.
 29. Morrissey J., Hruska K., Guo G. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function / *J.Am.Soc.Nephrol*. – 2002. – Vol. 13. –№ 1. – P. 14-21.
 30. Neilson E.G. Plasticity, nuclear diapause, and a requiem for the terminal differentiation of epithelia // *JASN*. – 2007. – Vol. 18. – № 7. – P. 1995-1998.
 31. Okada H., Danoff T.M., Kalluri R., Neilson E.G. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation // *Am.J.Physiol*. – 1997. – Vol. 273. – № 4. – P. 563-574.
 32. Pain M., Bermudes O., Lacoste P. et. al. Tissue remobilizing in chronic bronchial diseases: from epithelial to mesenchymal phenotype // *Eur. Respir. Rev*. – 2014. – Vol. 23. –№ 731. – P. 118-130.
 33. Park S.H., Choi M.J., Song I.K. et al. Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition // *JASN*. – 2007. – Vol. 18. – № 5. – P. 1497-1507.
 34. Ramos C., Becerril C., Montano M. et al. FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through MAPK/ERK kinase pathway // *AJP-Lung Cell. Mol.Physiol*. – 2010. – Vol. 299. – № 2. – P. 222- 231.
 35. Scarpa E., Mayor R. Collective cell migration in development // *J. Cell Biol*. – 2016. – Vol. 212. – № 2. – P. 143 -145.
 36. Schramek H., Feifel E., Marschitz I. et al. Loss of active MEK1-ERK1/2 restores epithelial phenotype and morphogenesis in transdifferentiated MDCK cells // *AJP-Cell Physiol*. – 2003. – Vol. 285. – № 3. – P. 652-661.
 37. Selman M. Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis // *Proc.Amer.Thoracic.Soc*. – 2006. – Vol. 3. – № 4. – P. 364-372.
 38. Shen M., Liu X., Zhang H., Guo S-W. Transforming growth factor β 1 signaling coincides with epithelial-mesenchymal transition and fibroblast- to –myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis in mice // *Human Reproduction*. – 2016. – Vol. 31. – № 38. – P. 355-369.
 39. Sheppard D. The role of integrins in pulmonary fibrosis // *Eur. Respir. Rev*. – 2008. – Vol. 17. – № 109. – P. 157-162.
 40. Shukla M.N., Rose J.L., Ray R., et al. Hepatocyte growth factor inhibits epithelial to myofibroblast transition in lung cells via Smad 7//*Amer.J.Respir.Cell Mol.Biol*. – 2009. – Vol. 40. – № 6. – P. 643-653.
 41. Strutz F, Muller G.A. Transdifferentiation comes of age // *Nephrol. Dial.Transplant*. –2000. – Vol. 15. – № 11. – P. 1729-1731.
 42. Tan T.K., Zheng G., Hsu T.T. et al. Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial –mesenchymal transition in vitro in murine renal tubular cells // *Amer.J.Pathol*. – 2010. – Vol. 176. – № 3. – P. 1256-1270.
 43. Thomas D.A.,Massague J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion on immune surveillance // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 8. – № 5. – P. 369-380.
 44. Valcz G., Sipos F., Tulassay Z. republished: Importance of carcinoma –associated fibroblast-derived proteins in clinical oncology // *Postgrad Med. J*. – 2015. – Vol. 91. –№ 1075. – P. 1026-1031.
 45. Vyas-Read S., Shaul P.W., YuhannaY.S., Willis B.C. Nitric oxide attenuates epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cell // *AJP Lung Cell.Mol.Physiol*. – 2007. – Vol. 293. – № 1. – P. 1212-1221.
 46. Wang S., Chen Q., Simon T C. et al. Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy // *Kidney Int*. – 2003. – Vol. 63. – № 6. – P. 2037-2049.
 47. Willis B.C., Liebler J.M., Luby-Phelps K. et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- β 1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am.J.Pathol*. – 2005. – Vol. 166. – № 5. – P. 1321-1332.

48. Willis B.C., Borok Z. TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease // *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – № 3. – P. 525-534.
49. Wipff P.J., Rifkin D.B., Meister J.J., Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix // *JCB.* – 2007. – Vol. 179. – № 36. – P. 1311-1323.
50. Yang J., Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis // *Am.J.Pathol.* – 2001. – Vol. 159. – № 4. – P. 1465-1475.
51. Yang J., Dai C., Liu Y. Hepatocyte growth factor gene therapy and angiotensin II blockade synergistically attenuate renal interstitial fibrosis in mice // *J.Am.Soc.Nephrol.* – 2002. – Vol. 13. – № 10. – P. 2464-2477.
52. Yang J., Liu Y. Blockade of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis // *J.Am.Soc.Nephrol.* – 2002. – Vol. 13. – № 1. – P. 96-107.
53. Yang Y.L., Lin Y.S., Chuang L.Y., Guh J.Y. et al. Bone morphogenetic protein-2 antagonizes renal interstitial fibrosis by promoting catabolism of type 1 transforming growth factor- β receptors // *Endocrinology.* – 2009. – Vol. 150. – № 32. – P. 727-740.
54. Xiong Y., Xiong W., Shang L. et al. hypoxia-inducible factor 1 α -induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells may contribute to the development of endometriosis // *Hum.Reprod.* – 2016. – Vol. 31. – № 6. – P. 1327-1338.
55. Zeisberg M., Shah A.A., Kalluri R. Bone morphogenetic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney // *J.Biol.Chem.* – 2005. – Vol. 280. – № 9. – P. 8094-8100.
56. Zeisberg M., Yang C., Martino M. et al. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition // *J.Biol.Chem.* – 2007. – Vol. 282. – № 32. – P. 23337-23347.
57. Zhang A., Wang M.H., Dong Z., Yang T. Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of epithelial-to-mesenchymal transition: interaction with hepatocyte growth factor // *AJP – renal Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – № 6. – P. 1323-1331.
58. Zhang A., Jia Z., Guo X., Yang T. Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin // *AJP-Renal Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – № 3. – P. 723-731.

V.I. Shcherbakov, T.I. Ryabichenko, G.A. Skosyreva, A.N. Trunov

Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition, pathogenesis, regulation, therapy

Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk

The review considered the issues of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and its role in inflammation, fibrosis, tumor growth. There were analyzed mechanisms and classification of EMT. A comparison of different forms of EMTs was performed. The important role of EMT in the formation of metastasis-initiating cells was noted. There were presented data on the role of fibroblasts in fibrosis of the lung, carcinogenesis. Stimulators and inhibitors of EMTs were summarized. There were considered intracellular paths that were associated with the development of the EMT under the influence of transforming growth factor β 1 (TGF - β 1). It also induced the development of local hypothyroidism, for easy expression of oncofetal genes, which was especially important in tumor growth. Therapy EMT was associated with blocking the actions of TGF - β 1 and was an important area in anticancer therapy.

Key words: epithelial-mesenchymal transition, fibrosis, tumor, transforming growth factor β 1

Поступила в редакцию 12.04.2017 г.