

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

Р.Х. Зулкарнеев, Ш.Р. Зулкарнеев, Г.Ф. Корытина,
И.А. Гибадуллин, А.М. Авзалетдинов, Л.С. Козырева,
А.И. Гимазова, Н.Ш. Загидуллин

DOI 10.25789/YMJ.2023.84.06

УДК: 616.24-004

СЫВОРОТОЧНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ФИБРОЗА ЛЕГКИХ

Целью исследования было изучение особенностей легочного фиброза (ЛФ) на основе сыровоточных биомаркеров у больных с идиопатическим ЛФ (ИЛФ) и COVID-19-ассоциированным фиброзом. Была исследована концентрация в сыворотке биомаркеров CA15-3, LOXL2, TGFBR3 и периостина у пациентов с ИЛФ, с COVID-19-ассоциированным фиброзом легких и в контрольной группе. Нами были выявлены значимые различия между уровнями в плазме LOXL2 в группе ИЛФ и КГ, группы ИЛФ и COVID-19-ассоциированного ЛФ. При ROC-анализе получены значения оптимальных точек разделения групп по уровню LOXL2 и периостина в сыворотке крови, что позволяет дифференцировать разные типы фиброза легких.

Ключевые слова: легочный фиброз, ИЛФ, COVID-19, CA15-3, периостин, TGFBR3, LOXL2.

The study of features of pulmonary fibrosis based on serum biomarkers in patients with ILF and COVID-19-associated fibrosis was carried out. Serum concentrations of biomarkers CA15-3, LOXL2, TGFBR3 and periostin in patients with ILF (n=10), COVID-19-associated pulmonary fibrosis and controls were investigated. Significant differences were found between LOXL2 concentrations in the control and ILF groups (p=0.003), ILF and COVID-19-associated fibrosis groups (p=0.036) and between periostin concentrations in the control and ILF groups (p=0.042). ROC analysis revealed the values of the optimal points of group separation by serum LOXL2 and periostin levels. This allows differential diagnosis of different pulmonary fibrosis.

Keywords: pulmonary fibrosis, IPF, COVID-19, CA15-3, periostin, TGFBR3, LOXL2.

Введение. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) является хроническим прогрессирующим интерстициальным заболеванием лёгких неизвестного происхождения со средней продолжительностью жизни 3-5 лет после установления диагноза. Заболевание сопровождается развитием прогрессирующего лёгочного фиброза (ЛФ), снижением функции легких, слабым ответом на терапию и ранней смертностью [7]. Всего в мире насчитывается около 3 млн больных ИЛФ [9]. По приблизительным оценкам, первичная заболеваемость в Европе составляет от 0,009 до 0,049 на

100 000 населения, в Северной Америке – 0,075-0,093, а уровень общей заболеваемости составляет 0,033-0,251 на 100 000 населения в Европе и 0,24-0,298 в Северной Америке [8].

При воздействии повреждающих факторов окружающей среды (сигаретный дым, вирусы, пыль) или вследствие аутоиммунного процесса при ИЛФ инициируется микроповреждение альвеолярного эпителия. Хотя запускающие механизмы заболевания могут различаться, прогрессирование ЛФ связано с активацией фактора роста, изменением регуляции ряда цитокинов и хемокинов, а также с эпигенетическим перепрограммированием фибробластов и ремоделированием сосудов [5].

Одним из самых неблагоприятных осложнений COVID-19 также является развитие легочного фиброза [15], которое значительно снижает качество жизни и впоследствии может приводить к летальному исходу. При COVID-19 ЛФ также исследуется ряд сыровоточных биомаркеров – предикторов его неблагоприятного течения [1- 3].

Для своевременного выявления пациентов с ЛФ, а также определения фенотипов заболевания определение сыровоточных биомаркеров представляется весьма перспективным. Учитывая общие патогенетические механизмы фиброза, предполагается, что биомаркеры активности заболевания

могут оказаться эффективными для выявления как ИЛФ, так и COVID-19-ассоциированного ЛФ. В качестве потенциальных биомаркеров ЛФ и ответа на антифибротическую терапию рассматривают SP-D (сурфактантный белок D), MMP-1, MMP-8, KL-6, CRPM-1, CRPM-8, C3M, C1M, 5mC, mH2A1, TOLLIP и MUC5B [1, 10, 19], а также CA15-3, TGFBR3, LOXL2 [16] и периостин и др.

Целью исследования было изучение диагностического значения сыровоточных биомаркеров LOXL2, периостина, TGFBR3 и CA15-3 у больных с ИЛФ и COVID-19-ассоциированным фиброзом.

Материалы и методы исследования. В продольном проспективном нерандомизированном исследовании участвовали 34 пациента: 1-я группа - с ИЛФ (n=10), 2-я – с COVID-19-ассоциированным ЛФ (n=11), 3-я – контрольная (КГ) (n=13). Все пациенты были госпитализированы в отделение пульмонологии или торакальное отделение клиники ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» (г. Уфа). Диагноз был установлен на основании клинического обследования, лабораторно-инструментальных исследований, включая компьютерную томографию высокого разрешения, спирометрию и видеоторакоскопическую биопсию легких. В рамках клинко-инструментального обследования были оценены индекс

Башкирский гос. медицин. ун-т МЗ РФ: **ЗУЛКАРНЕЕВ Рустэм Халитович** – д.м.н., проф. ORCID ID: 0000-0002-9749-7070, zurustem@mail.ru, **ЗУЛКАРНЕЕВ Шамиль Рустэмович** – студент, ORCID ID: 0000-0001-6522-8530, **КОРЫТИНА Гульназ Фаритовна** – д.б.н., проф., ORCID ID: 0000-0002-1695-5173; гл.н.с. ИБГ УФИЦ РАН, **ГИБАДУЛЛИН Иршат Асхатович** – аспирант, врач клиники БГМУ, ORCID ID: 0000-0001-9596-7342, **АВЗАЛЕТДИНОВ Артур Марсович** – д.м.н., проф., зав. отд. клиники БГМУ, ORCID ID: 0000-0002-2435-8141; **КОЗЫРЕВА Лилия Сергеевна** – к.м.н., зав. отд. клиники БГМУ, ORCID ID: 0000-0002-5087-393X, **ЗАГИДУЛЛИН Науфаль Шамильевич** – д.м.н., зав. кафедрой БГМУ, ORCID ID: 0000-0003-2386-6707; **ГИМАЗОВА Алия Илнуровна** – врач Гос. Новосибирской обл. клинич. б-цы, ORCID ID: 0000-0002-3954-2216.

массы тела, показатели внешнего дыхания (ЖЕЛ, ОФВ₁, ОФВ₁/ЖЕЛ). Кроме того, для каждой из групп была определена доля курящих пациентов с вычислением индекса курения, а также доля пациентов с различными сопутствующими заболеваниями.

Определение концентрации биомаркеров в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с дальнейшим определением оптической плотности при помощи фотоэлектроколориметра с длиной волны 450 нм. Использовали следующие наборы реактивов: RayBio® Human LOXL2 ELISA Kit (США), RayBio® Human TGF-beta RIII ELISA Kit (США), XEMA® CA15.3 (M12)-ИФА (Россия) и Aviscera Bioscience® HUMAN PERIOSTIN/OSF-2 ELISA KIT (США).

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» протокол №3 от 21.09.2022. Все пациенты подписывали информированное согласие для участия в исследовании.

Статистический анализ был проведен при помощи программы «STATISTICA» (версия 10.0). Для представления данных использовали методы непараметрической статистики: данные представлены в виде «медиана (интерквартильный размах Q1; Q3)». Для сравнения всех трех групп был применен критерий Краскела-Уоллиса, для парного сравнения групп U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. При определении пороговых значений концентраций биомаркеров для дифференцировки сравниваемых групп использовали ROC-анализ с расчетом чувствительности и специфичности. Также был проведен непараметрический корреляционный анализ с вычислением коэффициента корреляции Спирмена. Уровень $p < 0,05$ считался статистически значимым.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлена клинико-демографическая характеристика пациентов в исследуемых группах, а в табл. 2 – сравнительные результаты определения уровней биомаркеров в сыворотке крови обследуемых. Различия между группами определялись по возрасту (меньше в контроле, 42,0 (33,0; 51,7) лет против 56,5 (51,8; 63,4) и 59,0 (52,5; 63,7) в группах ИЛФ и COVID-19 ЛФ соответственно), и в группе ИЛФ снижались респираторные показатели ЖЕЛ (63,8% (54,3; 88,9)) и ОФВ₁ (57,0% (48,1; 93,4)). В группе COVID-19 чаще были пациенты мужского пола по сравнению с группами ИЛФ и кон-

троля (30% против 54,5 и 42,0% соответственно). Достоверных различий между другими параметрами не определялось.

Уровни значимости U-критерия и критерия Краскела-Уоллиса при сравнении концентрации остальных биомаркеров представлены в табл. 3. При анализе полученных результатов с использованием критерия Краскела-

Уоллиса значимые различия между всеми тремя группами были выявлены для LOXL2 ($p=0,015$). Также были обнаружены достоверные различия уровня LOXL2 при парном сравнении групп ИЛФ и КГ ($p=0,003$), групп ИЛФ и COVID-19-ассоциированного ЛФ ($p=0,036$). Также различия были найдены для периостина при парном сравнении групп ИЛФ и КГ ($p=0,042$).

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика пациентов

Наименование	ИЛФ	COVID-19 ЛФ	Контроль
(n)	10	11	13
Возраст, лет	56,5 (51,8; 63,4)	59,0 (52,5; 63,7)	42,0 (33,0; 51,7)
Пол, n (%)	М	6 (54,5)	4 (30,8)
	Ж	5 (55,5)	9 (69,2)
ИМТ, кг/м ²	28,6 (24,9; 29,5)	28,4 (24,6; 34,2)	28,4 (24,6; 34,2)
Курение, n (%)	Да	6 (54,5)	4 (30,77)
	Нет	5 (55,5)	9 (69,23)
ЖЕЛ, % должн.	63,8 (54,3; 88,9)	85,74 (66,6; 92,6)	81,1 (52,0; 87,6)
ОФВ ₁ , % должн.	57,0 (48,1; 93,4)	83,2 (73,2; 91,2)	86,97 (66,3; 94,1)
ОФВ ₁ /ЖЕЛ, % должн.	104,7 (86,9; 114,1)	105,3 (94,5; 115,1)	100,7 (87,9; 108,3)
СД 2 типа, n (%)	1 (10,0)	0	0
АГ, n (%)	2 (20,0)	3 (27,3)	0

Примечание. ИМТ – индекс массы тела; ЖЕЛ – жизненная ёмкость легких; ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за одну секунду, ОФВ₁/ЖЕЛ – индекс Тиффно, СД 2 типа – сахарный диабет 2-го типа, АГ – артериальная гипертензия.

Таблица 2

Уровни биомаркеров в изучаемых группах

Наименование	ИЛФ	COVID-19 ЛФ	Контроль
Периостин (нг/мл)	10,9 (6,6; 18,3)	6,9 (5,1; 13,1)	6,9 (4,1; 9,9)
СА 15-3 (Ед/мл)	3,6 (2,7; 6,1)	4,1 (3,1; 5,5)	3,3 (1,9; 5,0)
LOXL2 (пг/мл)	49,9 (23,4; 84,7)	13,8 (13,1; 62,2)	15,2 (12,6; 23,4)
TGFBR3 (нг/мл)	389,3 (330,5; 682,4)	472,1 (291,0; 859,6)	379,6 (223,9; 675,7)

Таблица 3

Уровни значимости p критерия Краскела-Уоллиса и U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни при сравнении уровней биомаркеров в изучаемых группах

Наименование	Критерий Краскела-Уоллиса	U-критерий ИЛФ и контроль	U-критерий COVID-19 ЛФ и контроль	U-критерий ИЛФ и COVID-19 ЛФ
LOXL2	0,015	0,003	0,955	0,036
Периостин	0,145	0,042	0,631	0,512
TGFBR3	0,638	0,557	0,303	0,756
CA15-3	0,443	0,468	0,228	0,605

Для групп с достоверно различными уровнями биомаркеров был проведен ROC-анализ. При разделении группы ИЛФ с контролем по уровню LOXL2 (рис. 1) площадь под ROC-кривой $AUC=0,854$ (95% ДИ 0,693-1,0, $p<0,0001$). Оптимальная точка отсечения групп по уровню LOXL2 составила 20,6 пг/мл (чувствительность 80,0% и специфичность 76,9%). При разделении группы ИЛФ с группой COVID-19-ассоциированным ЛФ (рис.2) по уровню LOXL2 площадь под ROC-кривой AUC была 0,773 (95% ДИ 0,556-0,989, $p=0,014$). Оптимальной точкой разделения групп по уровню LOXL2 было значение 14,0 пг/мл (99,0% и 63,6%). При разделении группы ИЛФ с контрольной группой по уровню периостина (рис.3) AUC оказалось равной 0,692 (95% ДИ 0,469-0,916, $p=0,092$). Оптимальная точка отсечения между группами по уровню периостина была 11,1 нг/мл (чувствительность 50,0% и специфичность 84,6%).

Также были рассчитаны коэффициенты ранговой корреляции Спирмена для уровней биомаркеров в объединенной группе обследуемых. Значимая положительная корреляция была обнаружена между концентрациями LOXL2 и периостином ($r_s=0,51$; 95% ДИ 0,20-0,73, $p=0,002$), TGFB3 и CA15-3 ($r_s=0,35$; 95% ДИ 0,0-0,62, $p=0,044$), CA15-3 и периостином ($r_s=0,38$; 95% ДИ 0,04-0,65, $p=0,025$).

Особенностью данного исследования является сравнительный анализ диагностической ценности четырех актуальных биомаркеров легочного фиброза – LOXL2, периостина, TGFB3, CA15-3, в двух группах пациентов с различными заболеваниями – ИЛФ и COVID-19-ассоциированным ЛФ. Несмотря на сравнительно небольшую численность групп, обнаружены значимые межгрупповые различия и корреляции уровней исследованных биомаркеров. Наибольшую диагностическую значимость показал биомаркер LOXL2, что, вероятно, связано с его выдающейся ролью в образовании фибротической ткани. LOXL2 – лизилоксидазоподобный белок 2 производит поперечную сшивку волокон коллагена, активацию фибробластов [11], способствует синтезу и накоплению коллагена, укреплению межклеточного матрикса. Ранее у больных с ИЛФ была выявлена повышенная экспрессия гена LOXL2 по сравнению с контрольной группой [12]. Повышение уровня LOXL2 фиксируется при ИЛФ [3, 13] и при фиброзах других локализаций – фиброзе печени,

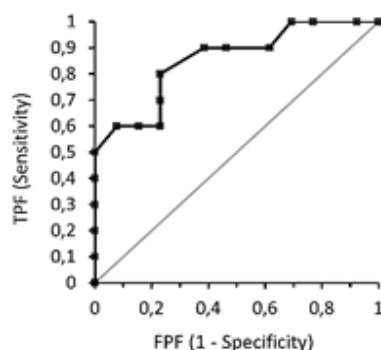


Рис. 1. ROC-анализ величин LOXL2 для разделения группы ИЛФ и контрольной группы.

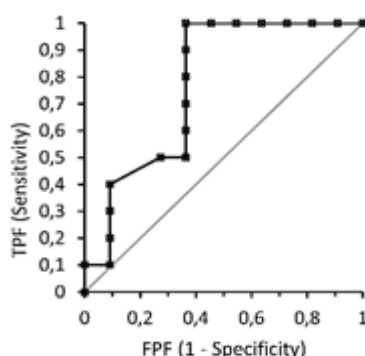


Рис. 2. ROC-анализ величин LOXL2 для разделения группы ИЛФ и группы COVID-19-ассоциированного ЛФ.

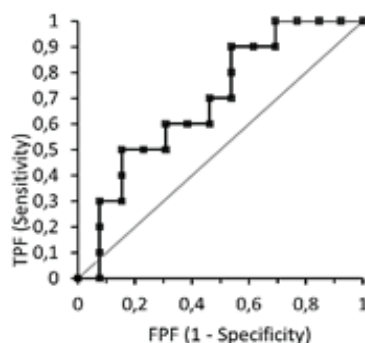


Рис. 3. ROC-анализ величин периостина для разделения группы ИЛФ и контрольной группы.

фиброзе сердца [11]. Концентрация LOXL2 в сыворотке более 700 пг/мл была ассоциирована с более высокими рисками прогрессирования ИЛФ [3]. Результаты нашего исследования, где наиболее высокие уровни LOXL2 были обнаружены у пациентов с ИЛФ, характеризующимся агрессивным развитием фиброза легких, согласуются с приведенными данными других исследований. В то же время существенно меньшие уровни LOXL2 при COVID-19-ассоциированном ЛФ, вероятно, отражают менее злокачественный

характер фибротического процесса у данной группы пациентов.

В нашем исследовании периостин также подтвердил свою диагностическую значимость в качестве биомаркера легочного фиброза. Повышение уровня его экспрессии наблюдается при воспалении, следствием чего являются ремоделирование и фиброз легочной ткани при ИЛФ, ХОБЛ, бронхиальной астме и раке легких [14]. Мономерный периостин, по данным [2], является одним из самых чувствительных и специфичных маркеров ИЛФ (площадь под кривой $AUC=0,958$). При концентрации 11,2 нг/мл чувствительность и специфичность составили соответственно 90,0 и 91,2%. В случае с общим периостином при установлении точки отсечения на уровне 77 нг/мл $AUC=0,843$, чувствительность и специфичность – 73,3% и 79,6% [2], что превосходит аналогичные показатели других важных биомаркеров легочного фиброза SP-D и KL-6 [20]. Увеличение сывороточной концентрации периостина более 117 мкг/мл было ассоциировано с прогрессированием ИЛФ [3], ухудшением показателей ЖЕЛ и диффузионной способности легких DL_{CO} в течение полугода [6].

Несмотря на то, что два других биомаркера TGFB3 и CA15-3 в нашем исследовании по ряду причин не показали диагностической значимости, они остаются весьма перспективными для диагностики легочного фиброза и оценки других сопутствующих ему процессов, в частности апоптоза. TGFB3 – рецептор трансформирующего фактора роста TGF- β третьего типа. Ингибирование TGFB3 усугубляет развитие легочного фиброза [10]. При определенных условиях TGFB3 связывает TGF- β [19], что приводит к снижению синтеза актина гладкомышечной ткани- α (SMA- α), фибронектина, коллагена I типа за счет ингибирования SMAD2/3, PI3K/Akt и MAPK сигнальных путей TGF- β [1].

CA15-3 – раковый антиген, наиболее активно экспрессирующийся при раке молочной железы [4]. Тем не менее повышение концентрации CA15-3 наблюдается и при ИЛФ [6]. По данным d'Alessandro M. et al., плазменная концентрация CA15-3 при ИЛФ более чем в 5 раз превышала уровень контроля [18]. В другом исследовании определение уровня CA15-3 позволило дифференцировать пациентов с различными видами легочного фиброза [17].

Обнаруженные корреляционные взаимосвязи между исследованными биомаркерами отражают их не-

посредственное и опосредованное участие в качестве звеньев сложных сигнальных путей, задействованных в процессе фиброизирования легких [5]. На этом основании биомаркеры легочного фиброза рассматриваются не только как важные диагностические и прогностические критерии, но и как мишени для высокоэффективной таргетной терапии этого процесса [12-14].

Выводы. Были выявлены существенно повышенные уровни биомаркеров LOXL2 и периостина при ИЛФ в сравнении как с контролем, так и COVID-19-ассоциированным легочным фиброзом. Установлены оптимальные точки разделения групп ИЛФ и COVID-19-ассоциированного ЛФ, групп ИЛФ и КГ по уровню LOXL2 20,6 пг/мл и 14,0 пг/мл соответственно. Аналогично для периостина точка разделения групп ИЛФ и контроля имела величину 11,1 нг/мл. В объединенной группе пациентов концентрации периостина и CA15-3, периостина и LOXL2, TGFBR3 и CA15-3 положительно коррелировали между собой. Необходимы дальнейшие исследования концентрации в плазме данных биомаркеров у больных с ИЛФ и COVID-19-ассоциированным ЛФ, что в перспективе позволит увеличить эффективность диагностики и прогноза легочного фиброза различной этиологии для определения оптимальной тактики лечения.

Исследование было выполнено при поддержке гранта РНФ, договор № 22-25-00019 от 16.12.2021 г.

Литература

1. Анаев Э.Х. Биомаркеры идиопатического легочного фиброза // Практическая пульмонология. 2016. №4. С. 24-30.
2. Анаев Е.Н. Biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis // Practical Pulmonology. 2016; 4: 24-30.
3. Ability of Periostin as a New Biomarker of Idiopathic Pulmonary Fibrosis / I. Okamoto [et al.] // MPeriostin. 2019: 79-87. DOI:10.1007/978-981-13-6657-4_9
4. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis / Guiot J. [et al.] // Lung. 2017; 195(3): 273-280. DOI:10.1007/s00408-017-9993-5
5. Combined detection of CA15-3, CEA, and SF in serum and tissue of canine mammary gland tumor patients / Fan Y. [et al.] // Sci Rep. 2021; 11(1): 6651. DOI: 10.1038/s41598-021-85029-4.
6. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis / Chanda D. [et al.] // Mol. Aspects Med. 2018; 65:56-69. DOI:10.1016/j.mam.2018.08.004
7. Existing and emerging biomarkers for disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis / Inchingolo R. [et al.] // Expert Review of Respiratory Medicine. 2018: 1-13. DOI:10.1080/17476348.2019.1553620
8. Genetic and non-genetic risk factors of idiopathic pulmonary fibrosis: A review / Zulkarneev S.R. [et al.] // Global Transl Med. 2022; 1(2): 107. DOI: 10.36922/gtm.v1i2.107
9. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis / Maher T.M. [et al.] // Respir Res. 2021; 22(1): 197. DOI: 10.1186/s12931-021-01791-z.
10. Idiopathic pulmonary fibrosis / Lederer D.J., Martinez F.J., Engl N. // J Med. 2018; 378:1811-1823. DOI:10.1056/NEJMra1705751
11. Inhibition of type III TGF- β receptor aggravates lung fibrotic process / Ahn J.Y. [et al.] // Biomed Pharmacother. 2010; 64(7): 472-6. DOI: 10.1016/j.biopha.2010.01.006.
12. Linking LOXL2 to Cardiac Interstitial Fibrosis / Erasmus M. [et al.] // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21(16). P. 5913. DOI:10.3390/ijms21165913
13. LOX/LOXL in pulmonary fibrosis: potential therapeutic targets / Chen L. [et al.] // Journal of Drug Targeting. 2018; 1-23. DOI:10.1080/1061186x.2018.1550649
14. LOXL2—A new target in antifibrogenic therapy? / Puente A. [et al.] // Int J Mol Sci. 2019;20(7): 1634. DOI: 10.3390/ijms20071634.
15. Periostin: A Potential Biomarker and Therapeutic Target in Pulmonary Diseases / Al-zobaidi N. [et al.] // J Pharm Pharm Sci. 2022; 25:137-148. DOI: 10.18433/jpps32306.
16. Progression to fibrosing diffuse alveolar damage in a series of 30 minimally invasive autopsies with COVID-19 pneumonia in Wuhan / Li Y. [et al.] // China Histopathology. 2021; 78(4): 542-555. DOI:10.1111/his.14249.
17. Proteomics in idiopathic pulmonary fibrosis: the quest for biomarkers / Khan T. [et al.] // Mol. Omics. 2021; 17(1): 43-58. DOI: 10.1039/d0mo00108b.
18. Serum CA 15-3 is increased in pulmonary fibrosis / Ricci A. [et al.] // Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2009; 26(1): 54-63.
19. Systematic Review and Metanalysis of Oncomarkers in IPF Patients and Serial Changes of Oncomarkers in a Prospective Italian Real-Life Case Series / d'Alessandro M. [et al.] // Cancers (Basel). 2021; 13(3): 539. DOI: 10.3390/cancers13030539.
20. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling / Vander Ark A., Cao J., Li X. // Cellular Signalling. 2018; 52:112-120. DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.09.002
21. The usefulness of monomeric periostin as a biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis / Ohta S. [et al.] // PLoS. One. 2017; 12(3): e0174547. DOI: 10.1371/journal.pone.0174547