

На правах рукописи

Адамовская Евгения Николаевна

**Интерстициальные болезни легких с фиброзным фенотипом:
клинико-лабораторные характеристики**

3.1.29. Пульмонология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Шмелев Евгений Иванович

Официальные оппоненты:

Айсанов Заурбек Рамазанович – доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра пульмонологии факультета дополнительного профессионального образования, профессор

Терпигорев Станислав Анатольевич – доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н. И. Пирогова» МЗ РФ, институт усовершенствования врачей, кафедра внутренних болезней, заведующий

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России

Защита состоится «26» ноября 2024 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.264.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» по адресу: 107564, г. Москва, ул. Яузская аллея, дом 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» по адресу: 107564, г. Москва, ул. Яузская аллея, дом 2 и на сайте www.critub.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук

Юхименко Наталья Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Интерстициальные заболевания легких (ИЗЛ) – гетерогенная группа болезней, которые характеризуются поражением легочного интерстиция и дистальных отделов дыхательных путей (Kolb M. et al., 2019). К ИЗЛ относятся более 200 заболеваний легких известной и неизвестной этиологии, которые различаются по клиническим проявлениям, течению, прогнозу, риску осложнений, летального исхода и требуют различного лечения. Прогрессирующее течение, при ИЗЛ может быть сопряжено с нарастанием фиброзирование легочной ткани. В таких случаях говорят о прогрессирующем фибротическом фенотипе (ПФФ) ИЗЛ (George P. et al., 2020). ИЗЛ с ПФФ требуют своевременного назначения антифибротической терапии для замедления темпов снижения легочной функции и риска летального исхода (Brown K. et al., 2020). Распространенность ИЗЛ с ПФФ составляет около 20 больных на 100 000 населения в Европе (Wijsenbeek M., Cottin V., 2020).

Гиперчувствительный пневмонит представляет собой диффузное ИЗЛ, вызванное сенсibilизацией к органической пыли животного или растительного происхождения у восприимчивых людей (D.V. Coultas et al., 1994). Клиническая симптоматика ГП зависит не только от интенсивности и продолжительности антигенного воздействия, но и состояния иммунологической защиты организма, что определяет разные варианты течения болезни. Необходимость повышения прогностической ценности привела к появлению новой классификации заболевания на фибротический и нефибротический фенотипы в зависимости от преобладающих патологических изменений на высокоразрешающей компьютерной томографии (ВРКТ) легких и/или при гистологическом исследовании биоптатов легочной ткани так как такая классификация имеет прямую корреляцию с прогнозом (M. Vasakova et al., 2017). Однако неоднородность клинических проявлений, типа и продолжительности воздействия, культурных традиций,

географических условий и факторов риска хозяина по-прежнему способствуют недостаточной диагностике ГП.

Саркоидоз органов дыхания, также относящийся к ИЗЛ, в 70% случаев протекает бессимптомно, но у (10% – 20%) пациентов в результате длительно сохраняющегося воспаления, может развиваться фиброз легких, что существенно снижает качество жизни пациентов и приводит к развитию дыхательной недостаточности (Саркоидоз. Клинические рекомендации, 2022).

В воспалительном процессе при ИЗЛ принимает участие большое количество провоспалительных и противовоспалительных медиаторов, от взаимодействия которых зависит исход воспаления и формирование фиброза. Остается дискуссионным вопрос о своевременности назначения антифибротических препаратов для улучшения качества жизни пациентов ИЗЛ с ПФФ. В настоящее время ведется активный поиск биомаркеров, позволяющих прогнозировать и определить раннее начало процесса фиброзирования, которые могли бы стать ориентиром для раннего назначения антифибротических препаратов.

Актуальность настоящего исследования определяется попыткой найти надежные клинические показатели и биомаркеры, позволяющие определить раннее начало процесса фиброзирования при ИЗЛ, а также послужит ориентиром при назначении и коррекции терапии больных ИЗЛ.

Цель исследования

Исследовать основные клинико-лабораторные показатели пациентов с фибротическим фенотипом хронического ГП и саркоидоза органов дыхания и выявить маркеры-предикторы фиброзирования, которые позволят своевременно провести коррекцию терапии.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать клинические проявления фибротического фенотипа у пациентов с хроническим ГП и саркоидозом органов дыхания.

2. Оценить связь клинико-рентгенологических показателей с данными спирометрии и диффузионной способности легких при хроническом ГП и саркоидозе.

3. Оценить различия уровня цитокинов (ФНО, ИФН γ) в сыворотке крови у пациентов с наличием или отсутствием клинико-рентгенологических признаков фибротического фенотипа при хроническом ГП и саркоидозе органов дыхания.

4. Оценить роль микроРНК как биомаркеров фиброобразования легочной ткани у пациентов с хроническим ГП и саркоидозом.

Научная новизна

Впервые показано повышение экспрессии микроРНК у пациентов с фибротическим фенотипом хронического ГП и саркоидоза органов дыхания, которые могут послужить диагностическими маркерами процесса фиброобразования легочной ткани: у больных с ФФ ГП – повышение экспрессии miR-106b, miR-150, miR-22; у больных с ФФ саркоидоза – достоверное повышение экспрессии miR-15, miR-22, miR-150 и снижение экспрессии miR-193a, miR-17-5.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведенного исследования расширяют представление о клинико-лабораторных характеристиках хронического ГП и саркоидоза с ФФ и возможностях ранней диагностики для своевременного назначения антифибротической терапии. Выявленная корреляционная зависимость между основными функциональными показателями и определенными микроРНК дает новые возможности для диагностики ФФ у пациентов с хроническим ГП и саркоидозом.

Методология и методы исследования

В представленной работе предпринята попытка поиска прогностических маркеров избыточного фиброобразования в легких.

Объектом исследования являются пациенты с ГП и саркоидозом органов дыхания. Предметом исследования являются клиничко-рентгенологические, функциональные, лабораторные, иммунологические показатели больных с ГП и саркоидозом органов дыхания. Гипотеза исследования представляет поиск маркеров фиброзирования при хроническом ГП и саркоидозе органов дыхания. Для решения поставленных задач были использованы эмпирические (наблюдение, описание) и универсальные методы научного познания.

В исследование были включены 230 пациентов с ГП и саркоидозом органов дыхания, находившиеся на лечении в клинике ФГБНУ «ЦНИИТ» с 2019 по 2022 г. Диагноз был установлен на основании клинических рекомендаций РРО по диагностике и лечению гиперчувствительного пневмонита, клинических рекомендаций РРО по диагностике и лечению саркоидоза, а также международных рекомендаций ERS/ATS/JRS/ALAT по диагностике и лечению гиперчувствительного пневмонита и Fleischner Society White Paper 2020 г.

Положения, выносимые на защиту

1. Для пациентов с фибротическим фенотипом ГП и саркоидоза органов дыхания в отсутствие антифибротической терапии в отличие от пациентов без фиброза по данным КТ ОГК в исходе болезни характерны более выраженные клинические проявления;

2. У пациентов с ГП, имеющих распространенные фиброзные изменения в легких на КТ ОГК, показатели DLCO были значимо ниже по сравнению с больными без фиброзных изменений в легких;

3. При фибротическом фенотипе ГП повышается экспрессия микроРНК: miR-106b, miR-150, miR-22. Для больных с фибротическим фенотипом саркоидоза характерно повышение экспрессии miR-15, miR-22, miR-150 и снижение miR-193a, miR-17-5.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Содержание диссертации соответствует паспорту научной специальности 3.1.29. Пульмонология (медицинские науки) и направлениям исследования: 1. Изучение органов дыхания, газообменной и нереспираторной функции легких в эксперименте и у человека (в эмбрио- и филогенезе, в возрастном аспекте, как в норме, так и при различных патологических состояниях) с использованием морфологических, гистохимических, молекулярно-биологических, инструментальных, культуральных, микробиологических и других методов исследований; 2. Клинические, биохимические, биофизические, иммунологические исследования системы защиты органов дыхания в норме и при различных патологических состояниях

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена анализом научной литературы по теме исследования, достаточным объемом проведенного исследования, использованием методик, адекватных поставленным задачам с применением современных методов статистического анализа.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 2 международных и всероссийских научных конференциях, в том числе на ежегодной научной конференции молодых ученых с международным участием в ФГБНУ «ЦНИИТ» 2020 г.; международном конгрессе Европейского респираторного общества (ERS) 2020 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты работы внедрены в научную и практическую деятельность отдела дифференциальной диагностики туберкулеза легких и экстракорпоральных методов лечения ФГБНУ «ЦНИИТ», а также в программу последипломного обучения врачей-пульмонологов РФ, клинических ординаторов и аспирантов в ФГБНУ «ЦНИИТ».

Связь темы диссертационной работы с планом научных работ организации

Диссертационное исследование проводилось в рамках научно-исследовательской работы отдела дифференциальной диагностики туберкулеза легких и экстракорпоральных методов лечения ФГБНУ «ЦНИИТ» № 122041100233-3 «Особенности течения различных заболеваний бронхо-легочной системы в современных условиях».

Личный вклад автора

Автор принимал участие на всех этапах работы от выбора темы исследования, постановки и реализации его задач, до обсуждения и выводов, сделанных в научных публикациях и докладах, а также внедрения в практическую деятельность. Автором лично проведен сбор исследовательского литературного, клинического и лабораторного материала, дано научное обоснование. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Публикации

По результатам диссертации опубликованы 3 научные работы в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, из них 3 – в журналах, входящих в международную реферативную базу данных Scopus, 3 доклада на Всероссийских конференциях молодых ученых, международном конгрессе ERS 2020 г.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 113 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа иллюстрирована 15 рисунками и 20 таблицами, 2 клиническими примерами. Список литературы содержит 157 источников, из них 22 отечественных и 135 зарубежных авторов.

Выражаю искреннюю признательность и благодарность за поддержку и неоценимую помощь по вопросам иммунологического исследования при подготовке диссертационного исследования заведующему отделом иммунологии д.м.н. Еремееву В.В. и заведующей лабораторией биотехнологии к.м.н. Шепельковой Г.С.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты с диагнозом гиперчувствительный пневмонит и саркоидоз ВГЛУ и легких, находившиеся на лечении в клинике ФГБНУ «ЦНИИТ» с 2019 по 2022 г. Диагноз был установлен на основании клинических рекомендаций РРО по диагностике и лечению гиперчувствительного пневмонита, клинических рекомендаций РРО по диагностике и лечению саркоидоза, а также международных рекомендаций ERS/ATS/JRS/ALAT по диагностике и лечению гиперчувствительного пневмонита и Fleischner Society White Paper 2020 г.

Критерии включения в исследование:

1. Возраст пациентов от 18 до 75 лет.
2. Подтвержденный диагноз гиперчувствительного пневмонита, саркоидоза ВГЛУ и легких,
3. Подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения (наличие хотя бы одного критерия делало невозможным участие пациента в исследовании):

1. Наличие активного инфекционного заболевания (в том числе, микобактериальной инфекции).
2. Декомпенсация хронических заболеваний различных органов и систем (хроническая сердечная недостаточность, сахарный диабет, гипертоническая болезнь, системные заболевания соединительной ткани).

3. Наличие в анамнезе тяжелой новой коронавирусной инфекции, осложненной пневмонией.
4. Обострение ИЗЛ менее, чем за 4 недели, до включения в исследование.
5. Наличие опухолевого заболевания.
6. Невозможность выполнения процедур, запланированных в протоколе исследования.
7. Беременность или кормление грудью,
8. Отказ пациента от участия в исследовании.

В результате анализа когорты пациентов, из 230 человек было отобрано 76 человек, полностью соответствовавших всем представленным критериям включения, и сформировано две группы:

– группа 1 – 44 пациента с ГП и наличием/отсутствием признаков фиброза легких; в 1 подгруппу пациентов, без рентгенологических признаков фиброза, включено 15 человек. Во 2 подгруппу с признаками фиброза включено 29 человек;

– группа 2: 32 пациента с саркоидозом органов дыхания и наличием или отсутствием фибротических изменений в легких. В 1 подгруппу пациентов, без рентгенологических признаков фиброза, включено 17 человек. Во 2 подгруппу с признаками фиброза включено 15 человек.

Среди обследованных было 31 мужчина и 45 женщин, в возрасте от 18 до 69 лет (средний возраст пациентов составил $49,9 \pm 12,8$ лет). Для оценки достоверности результатов иммунологических исследований была сформирована контрольная группа из 15 здоровых добровольцев. Среди них 8 женщин, 7 мужчин, их средний возраст составил $27,5 \pm 1,3$ лет.

Всем пациентам, включенным в исследование, проводились оценка жалоб, анамнеза, физикальное исследование.

Всем пациентам проводилась компьютерная томография (КТ) органов грудной клетки (ОГК) на мультисрезовом компьютерном томографе «Somatom Emotion-16» фирмы Siemens в положении больного лежа на спине, с заведенными руками за голову, задержкой дыхания от 10 до 30 секунд, со скоростью движения стола томографа 5 мм/сек и коэффициентом смещения 1,5 мм.

Для оценки наличия фибротических изменений по данным КТ ОГК использовали следующие критерии: наличие тракционных бронхоэктазов, картины «сотового легкого», ретикулярных изменений, уменьшение объема легких.

Всем пациентам в первые дни пребывания в стационаре проведены функциональные исследования легких, включавшие: спирометрию, бодиплетизмографию, исследование диффузионной способности легких для монооксида углерода методом однократного вдоха (DLCOc-SB) с задержкой дыхания.

Для оценки функции легких использовали следующие функциональные показатели: жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), диффузионную способность легких (DLCO), показатель удельной диффузии (DLCOc-SB/VA) скорректированных по гемоглобину. Границей нормальных значений ЖЕЛ, ФЖЕЛ, считали 80% д. в., DLCO-SB и DLCOc-SB/VA – 80% д. в. с учетом нижней и верхней границ нормы показателей.

Исследования вентиляционной и диффузионной функций выполняли на аппарате «Master Screen Body/Diffusion» фирмы «Jaeger» a subsidiary of «Viasys Healthcare» 2007 г., газов крови – на автоматическом газоанализаторе «Easy Blood Gas» фирмы «Medica» (США).

Всем пациентам проводился тест 6-минутной ходьбы (Т6МХ) с оценкой выраженности одышки по шкале Борга.

Иммунологическое обследование

У всех испытуемых на момент начала исследования получали 5 мл цельной венозной крови. Кровь центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин при 4°C. Полученные сыворотки крови хранили при -80°C до момента исследования.

Выделение суммарной РНК сыворотки крови у пациентов. К каждому образцу сыворотки крови перед выделением РНК добавляли miRNeasy Serum/Plasma Spike-in Control (миметик микроРНК *C. elegans* miR- 39) (QI-AGEN GmbH, Hilden, Germany) для мониторинга очистки и амплификации микроРНК. Экстракцию суммарной РНК из образцов сыворотки крови проводили с

использованием TRIzol LS (ThermoFisher Scientific (Invitrogen), Уолтем, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя. Впоследствии полученные образцы РНК использовали для постановки аррея miScript miRNA PCR Arrays (QI-AGEN GmbH, Hilden, Germany) и ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

Определение профиля экспрессии зрелых микроРНК проводили с использованием набора miScript miRNA PCR Arrays (QIAGEN GmbH, Хиден, Германия). Для постановки исследования препараты РНК были скомбинированы в 10 пулов – 2 пула сывороток крови пациентов фибротическим ГП, 2 пула – сывороток крови пациентов с ГП фиброза, 2 пула сывороток крови пациентов с фибротическим саркоидозом, 2 пула сывороток крови пациентов с саркоидозом без фиброза и 2 пула контролей (здоровые). Для комбинирования использовали равные объемы суммарной РНК. Каждый пул содержал по 6 образцов РНК (таблица 1).

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора miScript II RT Kit (QIAGEN, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученную кДНК использовали для постановки аррея. Данные аррея анализировали при помощи специального пакета программ GeneGlobe (QIAGEN, Массачусетс, США).

ПЦР в реальном времени. кДНК получали с помощью набора TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems), Массачусетс, США). Синтезированные кДНК в дальнейшем использовали в качестве матриц в реакциях qRT-PCR. TaqMan miRNA Assays (ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems), Массачусетс, США) использовали для анализа экспрессии miR-22, miR-193a, miR-107, miR-103a, miR-106b, miR-17, miR-150, miR-15a в соответствии с рекомендациями производителя.

Для исследования концентрации цитокинов/хемокинов в сыворотке крови больных ГП, больных саркоидозом и здоровых доноров использовали наборы фирмы R&D Systems, Inc. (Миниаполис, США).

Таблица 1 – Основные функции выделенных микроРНК

микроРНК	Функция
miR-22	регулирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты
miR-107	ингибирует HIF1 α рецептор тромбоцитарного фактора роста β

Продолжение таблицы 1

miR-150	участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе (развитие фиброза)
miR-106b	является модулятором передачи сигналов TGF/SMAD, т.е. участвует в непосредственной индукции фиброза
miR-193a	контролирует аутофагию, регулируя пути про-аутофагии инактивирует сигнальный путь АКТ/mTOR
miR-15a	участвует в супрессии воспаления и фиброза

В качестве референсного показателя для анализа и нормирования полученных данных использовалась miR-186, в соответствии с рекомендациями TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide (ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems), Массачусетс, США).

Для исследования концентрации цитокинов/хемокинов в сыворотке крови больных ГП, больных саркоидозом и здоровых доноров использовали наборы фирмы R&D Systems, Inc. (Миниаполис, США).

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета программ Microsoft Excel, Prism GraphPad, NanoStat. Описательная статистика использовалась для оценки ранговой вариации путем вычисления среднего арифметического (M), стандартного отклонения, ошибки среднего арифметического (m) и медианы нормального распределения (Me). Значимость различий анализировалась путем проверки нулевой гипотезы, которая при отсутствии различий была отвергнута при $p > 0,05$. Для оценки статистической достоверности использовали критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика группы 1

В группу пациентов с хроническим ГП включено 44 человека: в 1 подгруппу пациентов, без рентгенологических признаков фиброза, включено 15 человек. Во 2 подгруппу с признаками фиброза включено 29 человек.

Общая характеристика жалоб у пациентов с ГП представлена в табл. 2.

Таблица 2 – Характеристика жалоб у пациентов с ГП и отсутствием или наличием признаков ФФ.

Жалобы	Подгруппа 1, n=15	Подгруппа 2, n=29	p
Кашель, n(%)	12 (80%)	18 (62%)	0,143
Одышка			
mMRC 1-2, n(%)	5 (33,3%)	4 (13,7%)	0,474
mMRC 3-4, n(%)	10 (66,6%)	25 (86,2%)	0,036*

Примечание: * p<0,05.

В 1 подгруппе пациентов жалобы на кашель предъявляли 12 (80%) человек из 15, жалобы на одышку 1-2 степени были 5 (33,3%) человек, одышка 3-4 регистрировалась у 10 (66,6%) пациентов из 15.

Во 2 подгруппе пациентов, кашель регистрировался у 18 (62%) пациентов из 29, одышку первой степени отмечали 4 (13,7%) пациента из 29, одышку 3-4 степени-25 (86,2%) пациентов из 29.

Жалобы на слабость, повышение температуры тела предъявляли 5 (11,3%) пациентов среди двух подгрупп, что не позволило провести оценку статистической значимости.

При оценке аускультативной симптоматики у 20 (68,9%) из 29 пациентов во 2 подгруппе отмечалось наличие трескучих хрипов в базальных отделах легких, что чаще является патогномичным признаком для пациентов с фибротическим вариантом заболевания.

В таблице 3 представлены результаты оценки данных КТ ОГК у пациентов 1 группы.

Таблица 3 – Характеристика рентгенологических изменений в легких у пациентов с ГП и отсутствием или наличием признаков ФФ (n=44)

Изменения в легких	Все пациенты, n=44	1 подгруппа (без фиброза), n=15	2 подгруппа (с фиброзом), n=29	p (группа 1 и 2)
Симптом «матового стекла», n (%)	15 (34%)	10 (66,6%)	5 (17,2%)	0,01*
Тракционные бронхоэктазы, n (%)	24 (54,5%)	5 (33,3%)	19 (65,5%)	0,043*
Ретикулярные изменения, n (%)	23 (52,2%)	3 (20%)	20 (68,9%)	0,001*

Продолжение таблицы 3.

«сотовое легкое», n (%)	20 (68,9%)	-	20 (68,9%)	-
-------------------------	------------	---	------------	---

Примечание: * $p < 0,05$.

Оценка функциональных показателей

При исследовании вентиляционной функции легких по данным спирометрии в подгруппе пациентов с ФФ чаще доминировали рестриктивные нарушения функции легких – 15 из 29 человек (51,7%). В 10,3% случаев в этой подгруппе наблюдались рестриктивные изменения умеренной степени выраженности. В подгруппе пациентов без признаков ФФ превалировала нормальная вентиляционная функция легких, в обеих подгруппах встречались нарушения диффузионной способности легких и удельной диффузии у 30 пациентов из 44 (68,1%).

Результаты теста 6-минутной ходьбы представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Оценка результатов Т6МХ.

	Подгруппа 1, n=15	Подгруппа 2, n=29	p
SpO ₂ до Т6МХ, %	96,8±1,2	94,7±2,3	0,01*
Пульс до Т6МХ	78,6±3,4	79,5±5,3	0,9
Борг до Т6МХ, баллы	0,9±1,2	1,7±2,2	0,01*
Дистанция, м	347±74,4	310,5±53,1	0,202
SpO ₂ после Т6МХ, %	92±4,5	89,5±3,4	0,4
Пульс после Т6МХ	98,3±0,5	101,5±1,3	0,5
Борг после Т6МХ, баллы	2,2±1,2	3,6±1,1	0

Примечание: * $p < 0,05$.

При оценке результатов Т6МХ пациенты из 2 группы до начала теста отмечали более выраженную одышку по шкале Борга, по сравнению с пациентами из 1 подгруппы, в этой же подгруппе отмечалась более низкая сатурация. После проведения теста, статистически значимых различий не получено.

Иммунологическое исследование.

На рис. 1 представлены различия в экспрессии микроРНК как в сравнении с группой здоровых лиц, так и в подгруппах пациентов.

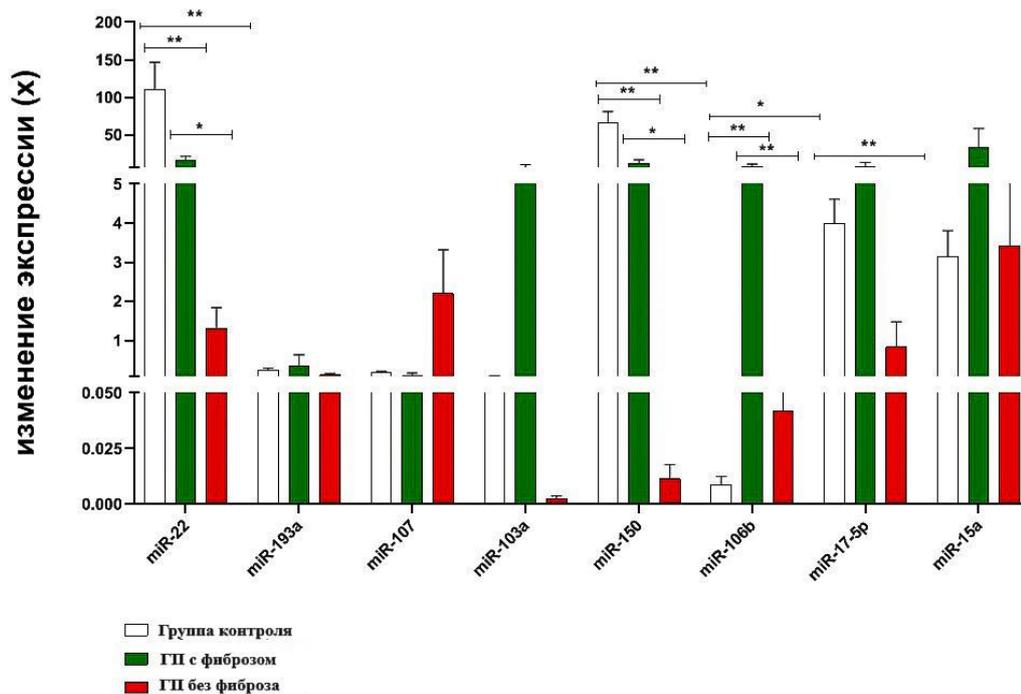


Рисунок 1 – Экспрессия генов, кодирующих зрелые микроРНК, в сыворотке крови больных с диагнозом ГП (с фиброзом и без) и группы здоровых лиц.

Анализ данных методом ПЦР в реальном времени показал, что у пациентов с фибротическим вариантом ГП была достоверно повышена экспрессия miR-106b (профибротическая), miR-150 (профибротическая) и miR-22 (профибротическая) по сравнению с пациентами с ГП без фиброза. У пациентов с диагнозом ГП без фиброза в сравнении группой контроля отмечено снижение экспрессии miR-22, miR-150, miR-17 и увеличение экспрессии miR-106b. У пациентов с фибротическим ГП в сравнении с контролем выявлено снижение экспрессии miR-22, miR-150 и увеличение экспрессии miR-106b (таблицы 5–6).

Таблица 5 – Результаты анализа данных уровня экспрессии между подгруппой пациентов без фиброза и группой здоровых лиц.

микроРНК	ГП без фиброза, УЕ	Группа здоровых лиц, УЕ	p
miR-106b	0,04	0,005	0,05
miR-22	1,3	110,8	0,02
miR-150	0,01	45,2	0,01
miR-17	0,83	4,002	0,03

Примечание: * p < 0,05.

Таблица 6 – Анализ данных уровня экспрессии микроРНК между группой пациентов с фиброзом и группой здоровых лиц.

микроРНК	ГП с фиброзом, УЕ	Группа здоровых лиц., УЕ	p
miR-106b	14,2	0,005	0,02*
miR-22	8,9	110,8	0,02*
miR-150	222,2	45,2	0,04*

Примечание: * $p < 0,05$.

Для значимых микроРНК был проведен корреляционный анализ между показателем диффузионной способности легких и уровнем экспрессии микроРНК (таблица 7).

Таблица 7 – Коэффициент корреляции между уровнем экспрессии микроРНК и DLCO у пациентов с ГП

	ГП без фиброза	ГП с фиброзом
miR-22	0,43	-0,15
miR-107	0,2	0,003*
miR-150	-0,35	0,04*
miR-106b	0,11	-0,04*
miR-17	0,5	-0,03*
miR-15a	0,1	0,25*

Примечание: * $p < 0,05$.

При оценке корреляции, отмечена достоверная отрицательная корреляционная связь между miR-106b (является профибротической) и показателем DLCO ($p < 0,05$) – чем больше экспрессия микроРНК, тем ниже уровень DLCO. Также была выявлена положительная корреляционная связь между miR-15a (является антифибротической) и показателем DLCO ($p < 0,05$) легких у пациентов с фибротическим вариантом ГП – чем больше уровень экспрессии микроРНК, тем выше уровень DLCO.

При исследовании уровня цитокинов в сыворотке крови пациентов обеих подгрупп выявлено повышение уровня ФНО у пациентов без фибротических изменений в легких в то время, как уровень ИФН γ был повышен у пациентов с ПФФ. При проведении сравнительного анализа, данные различия не были статистически значимыми ($p > 0,05$).

Характеристика группы 2

В группу 2 включены пациенты с саркоидозом ВГЛУ и легких.

В группу пациентов с саркоидозом включено 17 (39%) мужчин и 15 (60,9%) женщин.

В 1 подгруппу пациентов, без рентгенологических признаков фиброза, включено 17 человек. В 2 подгруппу с признаками фиброза включено 15 человек.

Общая характеристика жалоб представлена в табл. 8.

Таблица 8 – Характеристика жалоб у пациентов с саркоидозом органов дыхания и отсутствием или наличием признаков ФФ.

Жалобы	Подгруппа 1 (n=17)	Подгруппа 2 (n=15)	p
Кашель, n (%)	9 (52,9%)	12 (80%)	0,07
Одышка			
mMRC 1-2, n (%)	13 (76,4%)	6 (40%)	0,07
mMRC 3-4, n (%)	4 (23,5%)	12 (60%)	0,02*

Примечание: * p < 0,05.

В 1 подгруппе жалобы на кашель предъявляли 9 (52,9%) пациентов из 17, жалобы на одышку 1-2 степени были 13 (76,4%) пациентов, одышка 3-4 регистрировалась у 4 (23,5%) пациентов из 15.

Во 2 подгруппе, кашель регистрировался у 6 (40%) из 15 пациентов, одышку первой степени отмечали 6 (40%) из 15 пациентов, одышку 3-4 степени-12 (60%) пациентов из 15.

Жалобы на слабость, повышение температуры тела предъявляли 4 (11,3%) пациента из двух подгрупп, что не позволило провести оценку статистической значимости различий.

Характеристика КТ картины представлена в табл. 9.

Таблица 9 – Характеристика изменений в легких у пациентов с саркоидозом и отсутствием или наличием признаков ФФ. (n=32)

Изменения в легких	Все пациенты, n=32	1 подгруппа (без фиброза), n=17	2 подгруппа (с фиброзом), n=15	p (п/гр.1 и 2)
Перилимфатическая диссеминация, n (%)	20 (85,3%)	13 (76,4%)	7 (46,6%)	0,6

Продолжение таблицы 9

Внутригрудная лимфаденопатия, n (%)	20 (62,5%)	15 (88,2%)	5 (33,3%)	0,3
Тракционные бронхоэктазы, n (%)	16 (50%)	3 (17,6%)	13 (86,7%)	0,05*
Ретикулярные изменения, n (%)	16 (50%)	3 (17,6%)	13 (86,7%)	
«сотовое легкое», n(%)	13 (40,6%)	-	13 (86,7%)	-
Уменьшение объема легких, n (%)	12 (80%)	-	12 (80%)	-
Утолщение междольковых перегородок, n (%)	12 (80%)	-	12 (80%)	-

Примечание: *p < 0,05.

У пациентов 1-й подгруппы чаще встречались внутригрудная лимфаденопатия (13 (76,4%) из 17 пациентов) и перилимфатическая диссеминация (15 (88,2%) из 17 пациентов), тогда как во 2-й подгруппе в 86,7% случаев (у 13 пациентов из 15) регистрировались тракционные бронхоэктазы, ретикулярные изменения и «сотовое легкое», а также в 80% случаев (у 12 пациентов из 15), что является характерным для пациентов с ФФ саркоидоза.

Оценка функциональных показателей

Комплексный анализ частоты выявления, типа и степени нарушений вентиляционной функции легких показателей объемов и емкостей легких, бронхиального сопротивления, удельной бронхиальной проводимости, спирометрии и диффузионной способности легких, так же выявил нарушения функции внешнего дыхания. У преобладающего числа пациентов 15 из 32 выявлены нарушения газообменной функции легких. В подгруппе пациентов с признаками ФФ чаще встречались легкие нарушения DLCO – у 7 пациентов из 15 (46,6%).

Результаты Т6МХ представлены в табл. 10.

Таблица 10 – Оценка результатов Т6МХ у пациентов с саркоидозом и отсутствием или наличием признаков ФФ.

	1 подгруппа, n=17	2 подгруппа, n=15	p
SpO ₂ до Т6МХ, %	97,4±2,3	96,1±2,5	0,09
Пульс до Т6МХ	79,4±5,2	85,9±4,3	0,1

Продолжение таблицы 10

Борг до Т6МХ, балл	0,6±1,1	1,6±0,7	0
Дистанция, м	502,2±33,1	390,5±12,5	0,2
SpO2 после Т6МХ, %	95,5±0,7	92,3±1,2	0
Пульс после Т6МХ	104,1±3,2	107,6±2,4	0,2
Борг после Т6МХ, балл	2,3±1,4	4,1±1,5	0

При оценке результатов Т6МХ пациенты из 2-й подгруппы до начала теста отмечали более выраженную одышку по шкале Борга, по сравнению с пациентами из 1-й подгруппы, также в этой же подгруппе отмечалась более низкая сатурация. При этом, после проведения теста, статистически значимых различий не получено.

Иммунологическое исследование.

На рис. 4 представлены различия в экспрессии генов, кодирующих зрелые микроРНК в сыворотке крови больных саркоидозом с отсутствием или наличием признаков ФФ.

На рисунках 2–4 представлены различия в экспрессии микроРНК у пациентов с саркоидозом, по сравнению с группой здоровых лиц.

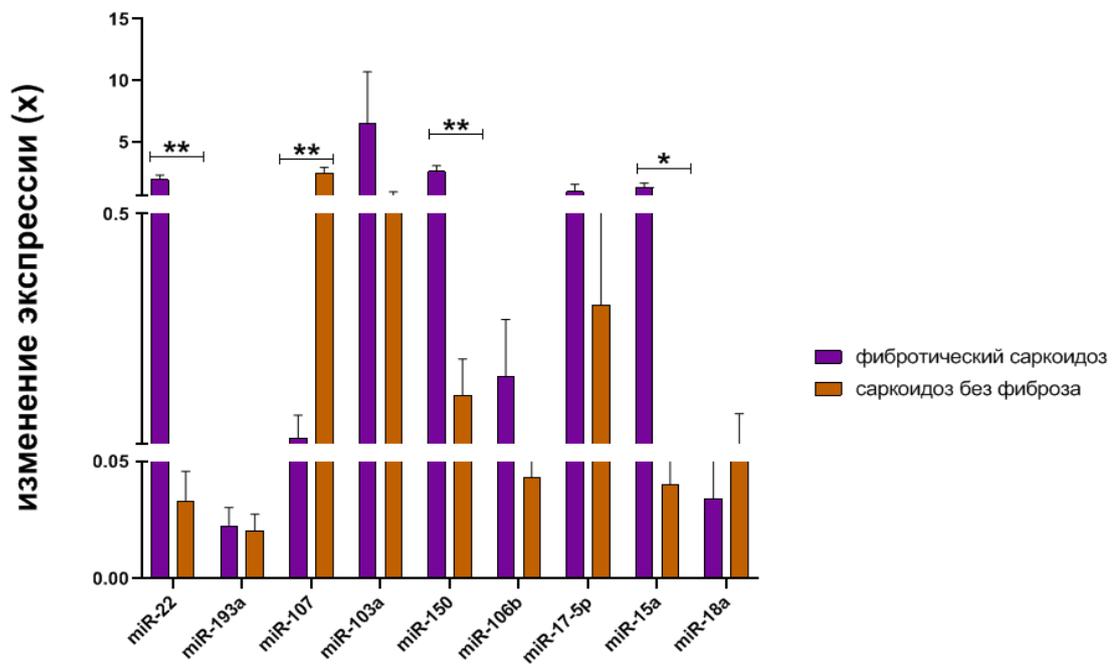


Рисунок 2 – Экспрессия генов, кодирующих зрелые микроРНК, в сыворотке крови пациентов с саркоидозом и отсутствием или наличием признаков ФФ и здоровых лиц.

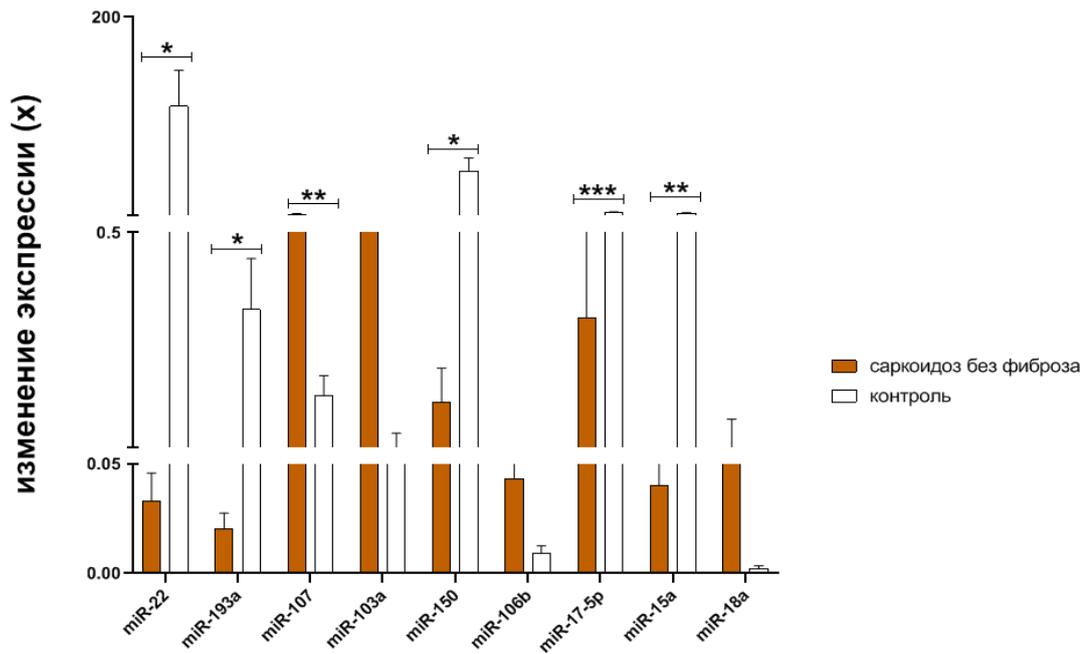


Рисунок 3 – Экспрессия генов, кодирующих зрелые микроРНК, в сыворотке крови пациентов с саркоидозом и отсутствием признаков ФФ и здоровых лиц

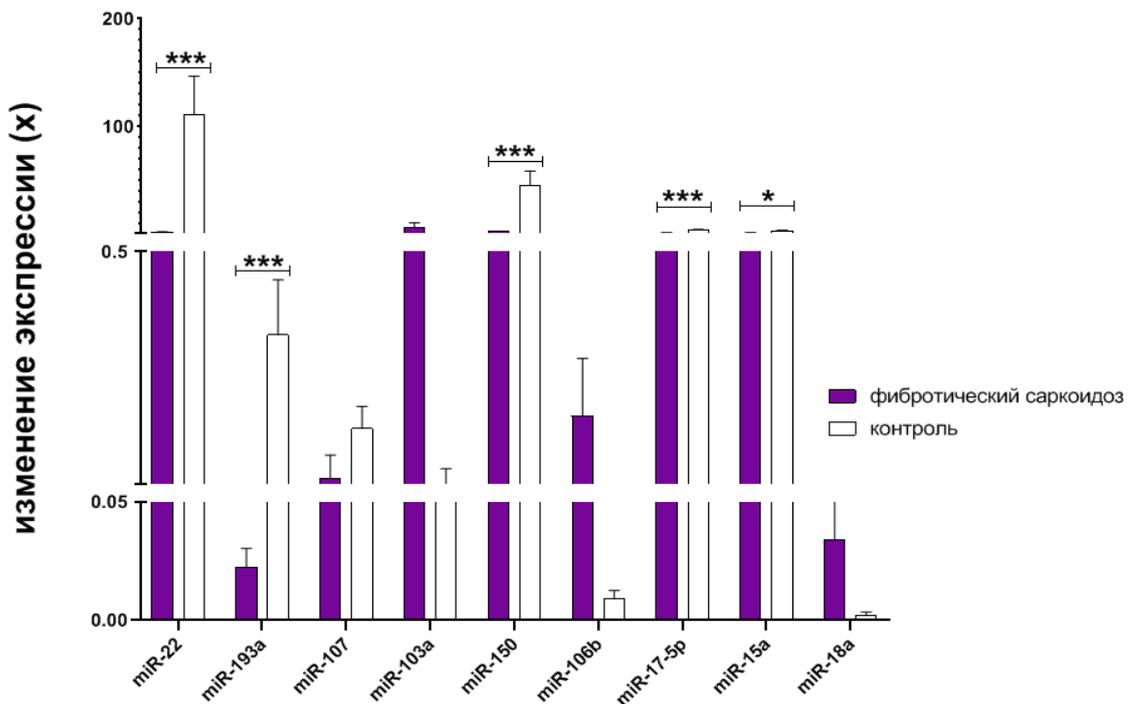


Рисунок 4 – Экспрессия генов, кодирующих зрелые микроРНК, в сыворотке крови пациентов с фибротическим саркоидозом и здоровых лиц

Анализ данных методом ПЦР в реальном времени показал, что у пациентов с фибротическим вариантом саркоидоза была достоверно повышена экспрессия miR-15a, miR-150 и miR-22 по сравнению с пациентами с саркоидоза без фиброза. У

пациентов с фибротическим вариантом саркоидоза была достоверно снижена экспрессия miR-193a, miR-22, miR-150 по сравнению с группой контроля, уровень экспрессии miR-15 и miR-17-5 был равен уровню таковых у пациентов из группы контроля. Ослабление регулирующего влияния микроРНК способствует активизации продукции провоспалительных факторов и как следствие приводит к образованию фиброза.

У пациентов с саркоидозом без фиброза в сравнении группой контроля отмечено снижение экспрессии miR-22, miR-150, miR-15a, miR-193a, miR-17-5 и увеличение экспрессии miR-107, miR103a (таблицы 11–12).

Также был проведен корреляционный анализ между показателем DLCO и уровнем экспрессии значимых микроРНК у пациентов с саркоидозом (табл. 13).

Таблица 11 – Результаты анализа данных уровня экспрессии микроРНК между группой пациентов без фиброза и здоровыми лицами

микроРНК	Саркоидоз без фиброза, УЕ	Группа здоровых лиц, УЕ	p
miR-107	2,4	0,17	0,002*
miR-15	0,04	3,13	0,002*
miR-22	0,03	110,8	0,03*
miR-150	0,16	45,2	0,03*
miR-193a	0,02	0,34	0,03*
miR-17-5	0,32	4	0,0005*

Примечание: * $p < 0,05$.

Таблица 12 – Результаты анализа данных уровня экспрессии микроРНК между группой пациентов с фиброзом и здоровыми лицами.

микроРНК	Саркоидоз с фиброзом, УЕ	Группа здоровых лиц, УЕ	p
miR-15	1,29	3,13	0,02*
miR-22	1,95	110,8	0,009*
miR-150	2,6	45,2	0,007*
miR-193a	0,02	0,34	0,006*
miR-17-5	0,9	4	0,003*

Примечание: * $p < 0,05$.

Таблица 13 – Корреляция между уровнем экспрессии микроРНК и DLCO у пациентов с саркоидозом

	Саркоидоз без фиброза	Саркоидоз с фиброзом
miR-22	0,02*	0,7
miR-107	0,3	0,6
miR-150	-0,039*	-0,25
miR-106b	0,02*	0,54
miR-17	-0,2	0,4
miR-15a	-0,01*	-0,1

Примечание: * $p < 0,05$.

Проведен корреляционный анализ между показателем DLCO и уровня экспрессии микроРНК. Отмечена достоверная отрицательная корреляционная связь между miR-15a, miR-150 и уровнем DLCO у пациентов без фиброза – чем выше уровень экспрессии микроРНК, тем ниже уровень диффузионной способности легких. Так же отмечена положительная слабая корреляционная связь между miR-22 и miR-106b (являются профибротическими).

При исследовании уровня цитокинов в сыворотке крови пациентов обеих групп, была выявлена тенденция к снижению уровня IFN γ у пациентов без признаков фиброза. Тенденция к повышению ФНО была выявлена у пациентов с признаками фиброза.

ВЫВОДЫ

1. Для пациентов с фибротическим фенотипом ГП и саркоидоза органов дыхания в отсутствие антифибротической терапии в отличие от пациентов без фиброза легких в исходе болезни характерно наличие выраженной одышки при незначительной физической нагрузке (mMRC 2-3 балла), сухой кашель, наличие трескучих хрипов в базальных отделах легких при аускультации;

2. У пациентов с хроническим ГП и признаками ФФ на КТ ОГК в отличие от пациентов без фиброзных изменений в легких на КТ ОГК отмечено достоверное снижение среднего показателя DLCO – $31 \pm 2,9\%$ и $66,7 \pm 4,1\%$, соответственно; при саркоидозе достоверных различий не получено – $58,9 \pm 13,6\%$ и $64 \pm 8,1\%$

3. Показано отсутствие статистически значимой связи между клинико-рентгенологическими признаками ФФ у пациентов с хроническим ГП и

саркоидозом органов дыхания и средними показателями цитокинов - ФНО и ИФН γ , что не позволяет использовать их для прогнозирования фиброобразования в легких.

4. Для больных с ФФ ГП характерно достоверное повышение экспрессии следующих микроРНК: miR-106b, miR-150, miR-22; у больных с ФФ саркоидоза - достоверное повышение экспрессии miR-15, miR-22, miR-150 и снижение экспрессии miR-193a, miR-17-5.

5. Выявление статистически значимого повышения уровня экспрессии miR-22, miR-150 у пациентов с ФФ саркоидоза может быть использовано в качестве маркера фиброобразования легочной ткани при саркоидозе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенты с хроническим ГП и саркоидозом требуют длительного наблюдения с мониторингом выраженности симптомов, периодическим проведением КТ ОГК, спирометрии, исследованием диффузионной способности легких и при выявлении тенденции к формированию фиброза – исследованием уровня микроРНК в сыворотке крови для подтверждения фиброзной трансформации легочной ткани.
2. При выявлении фиброобразования легочной ткани, необходимо решить вопрос об усилении противовоспалительной терапии или назначении антифибротической терапии.
3. Для выявления фибротического фенотипа ГП требуется определение экспрессии микроРНК miR-22, miR-150, miR-106b, miR17-5p; фибротического варианта саркоидоза – miR-22, miR-150, miR-107.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Возможности неинвазивной диагностики фибротического фенотипа интерстициальных заболеваний легких / Е.И. Щепихин, Е.И. Шмелев, А.Э.

Эргешов, А.С. Зайцева, Е.А. Шергина, **Е.Н. Адамовская** // Терапевтический архив. – 2023. – № 95(3). – С. 230–235. doi: 10.26442/00403660.2023.03.202073 [SCOPUS, ВАК].

2. Биологические маркеры фиброобразования у больных саркоидозом легких / Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, **Е.Н. Адамовская**, Е.И. Шмелев, В.В. Еремеев // Вестник современной клинической медицины. – 2024. – Т. 17, № 2. – С. 85–90. – doi: 10.20969/VSKM.2024.17(2).85-90 [SCOPUS, ВАК].

3. Шмелев, Е.И. Перспективы неинвазивной диагностики легочного фиброза / Е.И. Шмелев, Е.И. Щепихин, **Е.Н. Адамовская** // Практическая пульмонология. – 2024. – № 1. – С. 22–28 [ВАК].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГП – гиперчувствительный пневмонит

ЖЕЛ – жизненная емкость легких

ИЗЛ – интерстициальные заболевания легких

ИЛФ – идиопатический легочный фиброз

ИФН – интерферон

КТВР – компьютерная томография высокого разрешения

НсИП – неспецифическая интерстициальная пневмония

ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1 секунду

ПФФ – прогрессирующий фиброзирующий фенотип

ПЦР – полимеразная цепная реакция

САФЛ – саркоидоз, ассоциированный с фиброзом легких

СЗСТ – системное заболевание соединительной ткани

СОД – саркоидоз органов дыхания

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

ФВД – функция внешнего дыхания

ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

ФНО – фактор некроза опухоли

ФФ – фибротический фенотип

ATS – American Thoracic Society (Американское торакальное общество)

DLCO – диффузионная способность легких

ERS – European Respiratory Society (Европейское респираторное общество)

6ТМХ - тест 6-минутной ходьбы