

УДК 578.1

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНОГО ПРОГРАНУЛИНА У БОЛЬНЫХ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19): ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2022 F.B. Özgeriş^{1*}, Ö.F. Koçak², N. Kurt³, E. Parlak⁴, N. Yüce⁵, M.S. Keleş⁶

¹ Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey; e-mail: betul.ozgeris@atauni.edu.tr

² Department of Chemistry and Chemical Process Technologies, Erzurum Vocational College, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey

³ Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Erzincan Binali Yıldırım University, Erzincan, 24002 Turkey

⁴ Department of Infection Diseases, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey

⁵ Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey

⁶ Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Uskudar University, İstanbul, 34662 Turkey

Поступила в редакцию 07.12.2021

После доработки 29.01.2022

Принята к публикации 29.01.2022

В настоящей работе мы исследовали влияние уровня сывороточного програнулина на течение и тяжесть заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией (COVID-19). Также была изучена возможность использования этого параметра в качестве биомаркера у больных коронавирусной инфекцией. В исследовании участвовал 61 пациент с COVID-19, все больные были отнесены к следующим группам: бессимптомные, пациенты с легкой формой заболевания, пациенты средней тяжести и тяжелые. В образцах сыворотки крови, полученных от всех участников проекта, с помощью коммерческих наборов для проведения иммуноферментного анализа (ELISA) определяли концентрации програнулина, TNF- α и IL-6. Клинические показатели, такие как WBC, PLT, NE, LY, ALT, AST, Hb, PCT и CRP, определяли на биохимическом анализаторе. Все результаты анализа образцов крови больных мы сравнили с параметрами образцов 20 здоровых участников исследования. У больных с COVID-19 концентрация програнулина в сыворотке крови была статистически достоверно выше, чем в контрольной группе здоровых людей [$112,6 \pm 54,8, 0,0$ (0,0–54,2 пкг/мл соответственно, $p = 0,000$)]. Чтобы оценить возможность использования програнулина в качестве биомаркера у больных COVID-19 мы использовали ROC-анализ. Мы обнаружили, что для програнулина характерно более высокое значение AUC ($0,931 \pm 0,08$) и более статистически значимая величина p по сравнению с CRP ($p = 0,000$). Таким образом, мы пришли к выводу, что при коронавирусной инфекции уровни програнулина достигают высоких значений и могут быть использованы в качестве определяющего параметра при диагностике и прогнозировании течения болезни; уровень програнулина также может быть лучшим маркером по сравнению с CRP.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: COVID-19, CRP, IL-6, програнулин.

DOI: 10.31857/S0320972522030058

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь, вызываемая коронавирусной инфекцией COVID-19, или SARS-CoV-2 (тяжелый острый респираторный синдром, вызываемый коронавирусом, 2), ассоциирована со значительными нарушениями функции легких и множественными проявлениями в других органах и тканях, включая тромбоземболию, кровотече-

ния, повреждения миокарда, нарушение работы желудка и кишечника [1]. Спектр клинических проявлений варьирует от отсутствия симптомов и относительно легкого течения болезни до тяжелых и опасных для жизни состояний, требующих интенсивной терапии [2]. В связи с усилением эпидемии COVID-19 возникает острая необходимость в выявлении клинико-лабораторных предикторов прогрессирования в сторону тяжелых и фатальных форм течения этого заболевания.

Интерлейкин 6 (IL-6) и фактор некроза опухоли α (TNF- α) являются важными членами сети цитокинов, обладающими как противовоспалительными, так и провоспалительными свой-

Принятые сокращения: COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 г.; CRP – С-реактивный белок; IL-6 – интерлейкин-6; PRGN – програнулин; TNF- α – фактор некроза опухоли α .

* Адресат для корреспонденции.

ствами. Нарушение регуляции продукции цитокинов способствует развитию аутоиммунных состояний или персистенции инфекции, что приводит к поддержанию патологического хронического воспалительного состояния [3]. Белок IL-6 представляет собой провоспалительный цитокин, который стимулирует ответные реакции острой фазы, гематопоз и специфические иммунные реакции. Недавно было показано, что уровень этого цитокина коррелирует с высокой смертностью у пациентов с COVID-19 [4]. Из числа изученных цитокинов также была особо отмечена роль TNF- α , что обусловлено его расположением у истока каскада воспалительных реакций и наличия у него множества функций в работе иммунной системы [5].

Програнулин (PGRN), также известный как предшественник гранулина-эпителина, проэпителин [6], акрогранин [7] и эпителиальный трансформирующий фактор роста, представляет собой гликопротеин, состоящий из tandemных повторов 12 цистеин-содержащих модулей, называемых гранулиновыми или эпителиновыми доменами. Известно, что PGRN как плеiotропный фактор роста играет важную роль в поддержании и регуляции динамики гомеостаза в ходе нормального развития тканей, пролиферации, регенерации тканей и при иммунном ответе (HDR, host defense response). В связи с этими функциями белок активно исследовали в контексте развития инфекционных заболеваний, при заживлении ран, канцерогенезе, нейропролиферативных и нейродегенеративных заболеваниях [8]. Взаимосвязи между PGRN и воспалительными процессами носят сложный характер. PGRN связывается с рецепторами TNF- α и ингибирует TNF- α -зависимые сигнальные пути. В частности, PGRN блокирует способность TNF- α стимулировать респираторный взрыв нейтрофилов. На этом основании PGRN рассматривается как противовоспалительный фактор [9].

C-реактивный белок (CRP) является одним из неспецифических белков острой фазы ответа, синтезируемых в печени с участием IL-6-ассоциированного сигнального пути. Повышение его уровня служит в качестве биомаркера воспалительных процессов, инфекции и повреждения тканей [10, 11]. В ряде работ было обнаружено, что в сыворотке крови больных COVID-19 повышена концентрация этого белка [12–14].

Коронавирусная инфекция (COVID-19) является новым инфекционным заболеванием, для которого до настоящего времени не разработаны лабораторные маркеры для оценки тяжести заболевания. В связи с этим целью настоящей работы было изучение возможности ис-

пользования показателей уровня програнулина для предсказания течения и тяжести протекания болезни у пациентов с COVID-19, а также оценка того, может ли этот показатель быть использован в качестве биомаркера в таких случаях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Больные COVID-19 и здоровые люди были отобраны из числа посетителей инфекционного отделения исследовательской больницы университета имени Ататюрка. Группы были организованы из больных с COVID-19, а также здоровых пациентов со сходными демографическими показателями. COVID-19 диагностировали с помощью ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Для этого у больных брали образцы из носоглотки и ротовой полости. В контрольную группу были включены здоровые волонтеры со сходными с COVID-положительными пациентами демографическими показателями и отрицательными результатами ПЦР-тестирования на коронавирусную инфекцию при отсутствии каких-либо жалоб. Забор образцов крови производили после одобрения настоящего исследования этическим комитетом по проведению клинических исследований (No: B.30.2.ATA.0.01.00/411). Все случаи коронавирусной инфекции велись в соответствии с Национальными рекомендациями. Больные COVID-19 были разбиты на следующие группы: бессимптомные (AG, отсутствие симптомов, без отклонений от нормы при визуализационных исследованиях грудной клетки), больные с легкой формой при отсутствии осложнений (NCG, больные с такими симптомами, как повышенная температура, боли в мышцах и суставах, кашель, боли в горле при отсутствии дыхательных нарушений: частота дыхания < 24/мин, SpO₂ > 93% в комнатном воздухе и нормальная картина при рентгенографии грудной клетки и/или КТ легких), больные средней тяжести (MG, больные с такими симптомами, как повышенная температура, боли в мышцах и суставах, кашель, боли в горле, частота дыхания < 30/мин, SpO₂ > 90% в комнатном воздухе и признаки пневмонии от легких до средних на рентгеновских снимках и/или КТ) и тяжелобольные (SG, больные с такими симптомами, как лихорадка, боли в мышцах, суставах, кашель и боли в горле с учащенным поверхностным дыханием (тахипноэ, частота дыхания \geq 30/мин), уровень SpO₂ \leq 90% в комнатном воздухе и признаки двусторонней пневмонии, выявляемые при рентгенографии или КТ грудной клетки). В первый день поступления производили забор крови у больных в

группах MG и SG. В эти группы входили пациенты, принимавшие различные противовирусные препараты (Tamiflu, Plaquanil, Favipavir) и при этом не имевшие хронических заболеваний (таких как ХОБЛ, туберкулез или СПИД). Больные, принимающие антидепрессанты или получающие химиотерапию, в исследование включены не были. Здоровые добровольцы – взрослые люди старше 18 лет, сопоставимые по возрасту с группой больных, имеющие нормальные показатели физического развития и нормальные результаты рутинных анализов, не беременные и не имеющие хронических заболеваний, таких как ХОБЛ, туберкулез или СПИД. Все больные с COVID-19 (COVID-19 (+)), вошедшие в группу тяжелобольных, получали медицинскую помощь в отделении интенсивной терапии (ICU, intensive care unit), и девять больных были подключены к аппарату искусственной вентиляции легких. В начале настоящего исследования образцы крови были получены в общей сложности от 95 человек, и все они были включены в число участников исследования. Однако с учетом критериев включения и исключения четверо молодых людей моложе 20 лет, восемь человек, чьи образцы сыворотки крови подверглись гемолизу, а также двое пациентов, получивших отрицательный результат при повторном ПЦР-тестировании, были исключены из настоящего исследования. В итоге в настоящем исследовании были использованы образцы сыворотки крови, полученные от 81 человека.

Биохимический и клинический анализ крови. У больных, госпитализированных в нашу больницу, были взяты образцы крови. Часть образцов была отправлена в лабораторию при больнице для проведения рутинных анализов, а другая часть – в лабораторию отделения медицинской биохимии медицинского факультета университета имени Ататюрка для определения уровней IL-6, TNF- α и PGRN. Результаты тестов на IL-6, TNF- α и PGRN, полученные для каждого пациента, регистрировали вместе с информацией о возрасте, поле, коморбидных состояниях и биохимических параметрах крови (ALT, AST, WBC, NE, LY, PLT, Hb, PCT и CRP).

Определение уровня IL-6, TNF- α и PGRN в сыворотке крови. Концентрации TNF- α в образцах сыворотки крови определяли с помощью специфичного для белков человека иммуноферментного анализа (Hu TNF-ELISA kit; Cat. No. KE00154, AuthentiKine, США). Концентрации сывороточного IL-6 измеряли с использованием специфичного для белков человека иммуноферментного анализа (Hu IL-6 ELISA kit; Cat. No. KE00139, AuthentiKine). Определенные концентрации PGRN в образцах сыворотки

крови проводили с использованием соответствующего набора для иммуноферментного определения белков (Hu PGRN ELISA kit; Cat. No. MBS163502, MyBioSource, Бельгия). Анализ IL-6, TNF- α и PGRN проводили с использованием микропланшетного ридера (XS Powerwave, BioTEK, США).

Статистическая обработка результатов. Для проведения статистической обработки полученных результатов нами был использован пакет программ IBM SPSS 20.0. Полученные результаты представлены в виде среднего значения, стандартного отклонения, минимального и максимального значений, процента и количества. Для определения нормального распределения непрерывных величин использовали критерий Колмогорова–Смирнова. При сравнении двух независимых групп для данных с нормальным распределением использовали *t*-критерий для независимых образцов, а в других случаях применяли *U*-критерий Манна–Уитни. При сравнении непрерывных величин из более чем двух независимых групп и при условии соблюдения нормального распределения использовали критерий ANOVA. В противном случае использовали критерий Краскела–Уоллиса. Для анализа данных с нормальным распределением использовали корреляционный анализ Пирсона, а для других данных – корреляционный анализ Спирмена.

Анализ данных с использованием ROC-кривой (ROC, receiver operating characteristic) применяли с целью оценки возможности использования непрерывных величин для диагностики, а также определения порогового значения, положительной прогностической ценности (PPV, positive predictive value), отрицательной прогностической ценности (NPV) и площади под кривой (AUC, area under the curve). Уровень статистической значимости для всех данных был установлен на значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены демографические характеристики и параметры радиологических снимков пациентов с COVID-19 и контрольной группы здоровых людей. Статистически достоверных различий между средним значением возраста объединенной группы больных и контрольной группы ($p = 0,997$) обнаружено не было. 49,3% из 81 участника исследования составляли женщины, 50,7% – мужчины.

В то время как програнулин был обнаружен только у 4 из 20 человек в контрольной группе, то среди больных он отсутствовал лишь у 6 из 61

Таблица 1. Демографические характеристики и параметры изображений для контрольной группы и больных с COVID-19

Переменные	PG					HCG (n = 20)
	AG (n = 10)	NCG (n = 13)	MG (n = 25)	SG (n = 13)	Всего PG (n = 61)	
Возраст (лет)	39,4 ± 14,1	38,1 ± 17,1	53,0 ± 18,1	59,0 ± 13,8	48,8 ± 18,4	48,9 ± 15,9
Пол (женщин/мужчин)	6/4	9/4	11/14	4/9	30/31	10/10
Радиологические параметры (N/GG/GG+C)	8/2/0	8/4/1	1/20/4	0/4/9	17/30/14	–
Выживаемость (живы/мертвы)	10/0	13/0	25/0	6/7	54/7	–

Примечание. PG (patient group) – группа больных с COVID-19 (COVID-19 (+)); AG (asymptomatic group) – группа бессимптомных больных; NCG (noncomplicated group) – группа больных без осложнений; MG (moderate group) – группа пациентов с болезнью средней тяжести; SG (severe group) – группа тяжелобольных; HCG (healthy control group) – контрольная группа здоровых людей; N (normal) – норма; GG (ground glass) – «матовое стекло»; GG + C – «матовое стекло» + уплотнение.

человека. Поскольку степень поглощения в образцах с недетектируемым содержанием програнулина была такой же, как в пустом образце, концентрация програнулина в этих образцах была принята равной 0,00 мг/л. Концентрация сывороточного програнулина была статистически достоверно выше в группе больных COVID-19 по сравнению с контрольной группой здоровых людей ($p = 0,000$). Не было выявлено статистически достоверных различий между уровнями програнулина в подгруппах больных COVID-19 ($p = 0,078$). Диаграммы типа «ящик с усами» для подгрупп больных

COVID-19 и контрольной группы представлены на рис. 1. Не было выявлено статистически значимых различий в уровнях TNF- α и IL-6 между группами больных и контрольной группой или между подгруппами больных ($p = 0,000$). Не выявлено статистически достоверных различий между подгруппами больных COVID-19 по биохимическим параметрам ALT, AST, WBC, NE, LY, PLT, PCT и Hb. Было выявлено значительное снижение NE, LY и PLT и значительное повышение Hb в объединенной группе больных по сравнению с контрольной группой. В то же время концентрация CRP отличалась как между

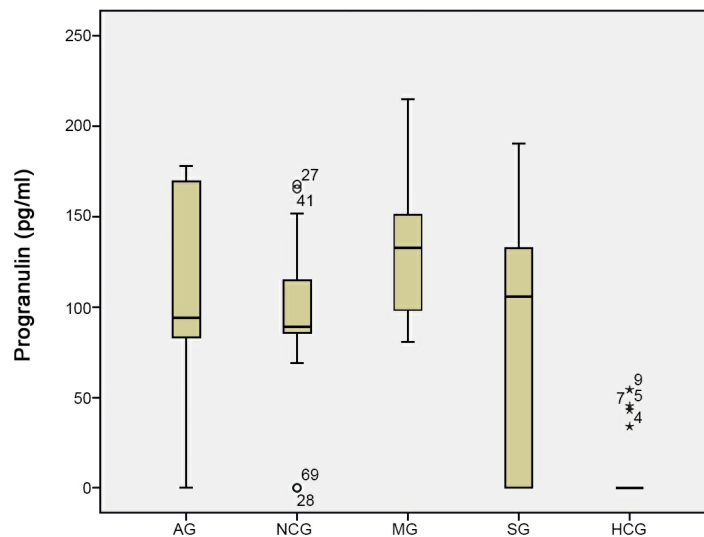


Рис. 1. Диаграммы типа «ящик с усами», демонстрирующие уровень сывороточного програнулина в контрольной группе и подгруппах больных с COVID-19 (COVID-19 (+)) ($p = 0,000$). Обозначения: AG – бессимптомная группа; NCG – группа без осложнений; MG – группа больных средней тяжести; SG – группа тяжелобольных; HCG – контрольная группа здоровых людей

Таблица 2. Биохимические показатели здоровых людей из контрольной группы и больных с COVID-19

Переменные	PG						HCG (n = 20) Среднее значение ± SD или медиана (min-max)	p ² - значе- ние
	AG (n = 10) Среднее значение ± SD или медиана (min-max)	NCG (n = 13) Среднее значение ± SD или медиана (min-max)	MG (n = 25) Среднее значение ± SD или медиана (min-max)	SG (n = 13) Среднее значение ± SD или медиана (min-max)	p ¹ - значе- ние	Total PG (n = 61) Среднее значение ± SD или медиана (min-max)		
PRG (пкг/мл)	112,8 ± 58,8	94,5 ± 52,5	132,8 ± 39,1	91,6 ± 70,2	0,078	112,6 ± 54,8	0,0 (0,0–54,2)	0,000
TNF-α (пкг/мл)	22,4 ± 8,9	23,1 ± 4,3	26,2 ± 7,1	34,3 ± 7,6	0,00	26,68 ± 8,1	18,8 ± 4,5	0,038
IL-6 (пкг/мл)	25,1 ± 13,0	38,9 ± 8,4	67,8 ± 18,8	92,1 ± 12,2	0,00	60,15 ± 27,59	20,27 ± 10,9	0,000
ALT (U/л)	36 (13–79)	17 (10–37)	20 (7–80)	20 (10–43)	0,392	20 (7–80)	27 (11–93)	0,796
AST (U/л)	27,0 ± 12,2	27,3 ± 8,4	24,1 ± 7,8	30,9 ± 9,1	0,194	26,7 ± 9,1	28,1 ± 20,0	0,700
WBC (×10 ³)	8,3 ± 1,7	6,4 ± 3,1	6,2 ± 2,8	6,1 ± 1,2	0,140	6,6 ± 2,5	8,5 ± 2,8	0,050
NE (×10 ³)	5,01 ± 1,7	5,0 ± 0,3	5,4 ± 0,2	5,8 ± 2,5	0,065	5,5 ± 2,5	5,2 ± 2,1	0,035
LY (×10 ³)	1,8 ± 0,5	1,7 ± 1,0	1,4 ± 0,9	1,2 ± 0,4	0,153	1,5 ± 0,8	2,3 ± 1,1	0,000
PLT (×10 ⁶)	240 (191–281)	240 (154–385)	240 (135–408)	192 (51–291)	0,238	227 (51–408)	280 (166–616)	0,000
Hb (г/дл)	15,6 ± 1,9	14,8 ± 2,1	14,7 ± 1,7	14,6 ± 0,9	0,366	14,8 ± 1,7	13,2 ± 2,6	0,002
CRP (мг/л)	3,5 (3,1–47,0)	3,1 (3,1–53,1)	3,2 (3,1–66,1)	30,5 (3,0–192,0) ^{a,b,c}	0,015	3,7 (3,0–192,0)	1,2 (0,0–5,38)	0,000
PCT (нг/мл)	0,047 ± 0,1	0,049 ± 0,1	0,043 ± 0,1	0,039 ± 0,2	0,47	0,044 ± 0,0	–	–

Примечание. PG – группа больных с COVID-19 (COVID-19 (+)); AG – группа асимптоматичных больных; NCG – группа больных без осложнений; MG – группа больных средней тяжести; SG – группа тяжелобольных; HCG – контрольная группа здоровых людей; PRG – програнулин; TNF-α – фактор некроза опухоли α; IL-6 – интерлейкин 6; WBC – лейкоциты; ALT – аланинаминотрансфераза; Ast – аспаргатаминотрансфераза; Hb – гемоглобин; PLT – тромбоциты; NE – нейтрофилы; LY – лимфоциты; CRP – С-реактивный белок; PCT – прокальцитонин; ^a, $p < 0,05$ при сравнении с AG; ^b, $p < 0,05$ при сравнении с NCG; ^c, $p < 0,05$ при сравнении с MG; p^1 , сравнение между подгруппами COVID-19 (+); p^2 , сравнение между группами PG и HCG.

группой больных и контролем, так и между подгруппами больных с COVID-19. Биохимические параметры крови для всех групп представлены в табл. 2.

В группе больных COVID-19 не было обнаружено значительной корреляции между уровнями програнулина и другими параметрами. В то же время в подгруппах больных COVID-19 была выявлена положительная корреляция с CRP ($r = 0,474$, $p = 0,017$) – в группе больных

MG, и отрицательная корреляция с PLT – в группе тяжелобольных ($r = -0,578$, $p = 0,038$) (рис. 2). С другой стороны, если рассматривать всех участников, то наблюдается положительная корреляция между уровнями програнулина, TNF-α и IL-6 ($r = 0,260$, $p = 0,018$, $r = 0,461$, $p = 0,000$ соответственно) (рис. 3).

Для оценки потенциала програнулина в качестве биомаркера у больных COVID-19 был проведен ROC-анализ. Мы обнаружили, что значение AUC для програнулина было выше и значение p – более значимым по сравнению с CRP. Пороговое значение было равно 38 пкг/мл в случае програнулина и 6 мг/мл – для CRP. Также были рассчитаны величины положительной прогностической ценности (PPV) и отрицательной прогностической ценности (NPV). Рассчитанные параметры ROC-анализа представлены в табл. 3 и на рис. 4.

Болезнь, вызванная коронавирусной инфекцией, которая создала существенные проблемы для системы здравоохранения во всем мире, протекает у людей по-разному. Поэтому выявление

Таблица 3. Результаты ROC-анализа содержания програнулина и CRP

Биомаркер	AUC (CI%)	p- значение	PPV (CI%)	NPV (CI%)
PRG	0,931 (87,6–98,6)	0,000	91,8 (82,3–82,4)	69,5 (52,5–82,5)
CRP	0,791 (66,8–91,3)	0,000	93,3 (79,1–88,2)	34,6 (28,7–40,9)

Примечание. CI (coefficient interval) – интервал коэффициента.

ние параметров, с помощью которых будет возможно осуществлять мониторинг тяжести протекания и последствий этой болезни, внесет значительный вклад в патофизиологию. Количественные параметры, отражающие стадию развития заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией, чрезвычайно важны для классификации пациентов по степени тяжести заболевания и быстрого применения эффектив-

ного лечения. В настоящей работе в сыворотке крови больных COVID-19 различной степени тяжести были определены концентрации IL-6, TNF- α и PGRN, а также различные биохимические параметры, которые сравнивались с соответствующими параметрами у здоровых людей. В результате оценки этих потенциально важных данных были предложены новые диагностические мишени.

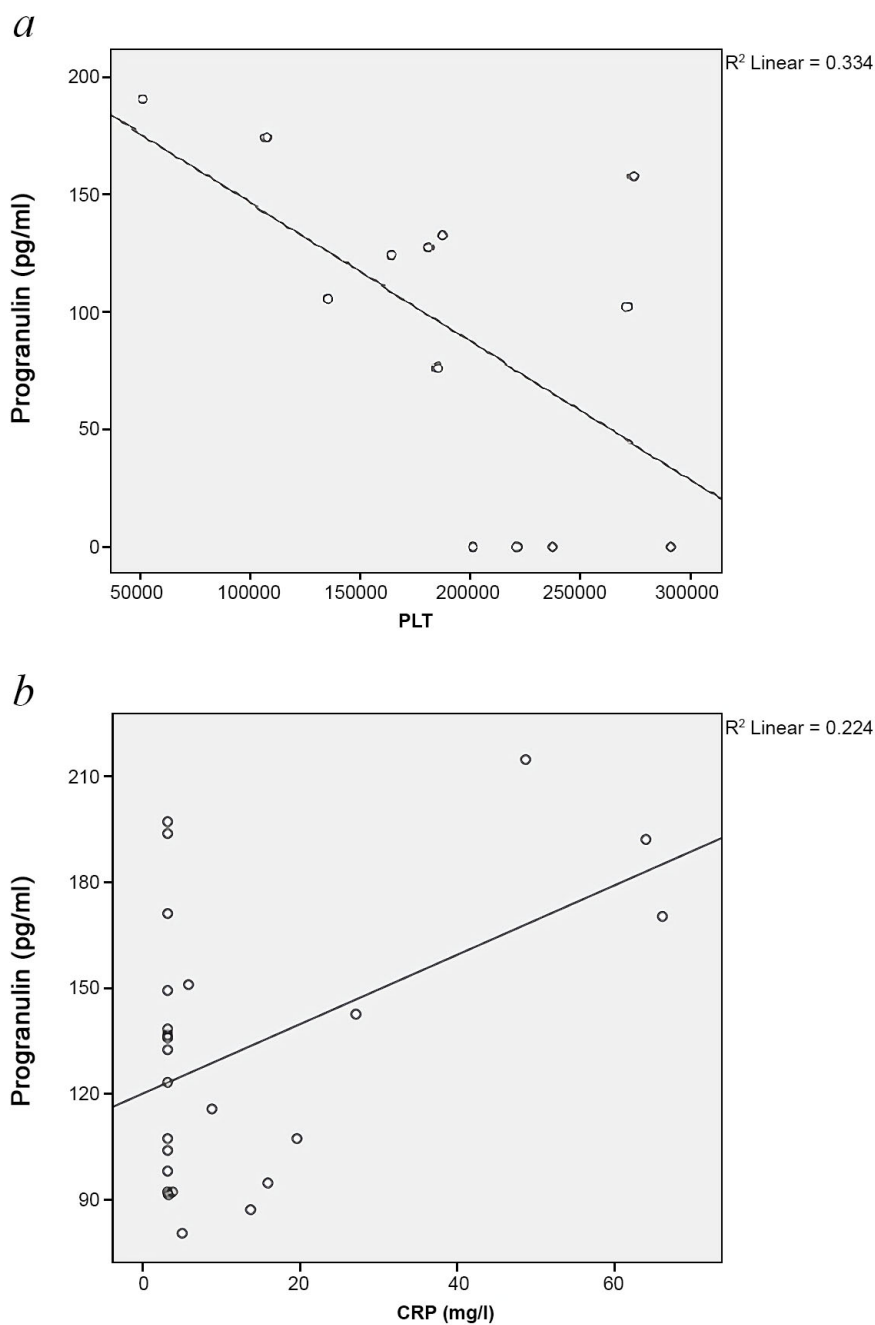


Рис. 2. *a* – Диаграмма разброса корреляции уровня програнулина и PLT в группе тяжелобольных ($R^2 = 0,334$, $r = -0,578$, $p = 0,038$); *b* – диаграмма разброса корреляции уровня програнулина и CRP в группе MG ($R^2 = 0,224$, $r = 0,474$, $p = 0,017$)

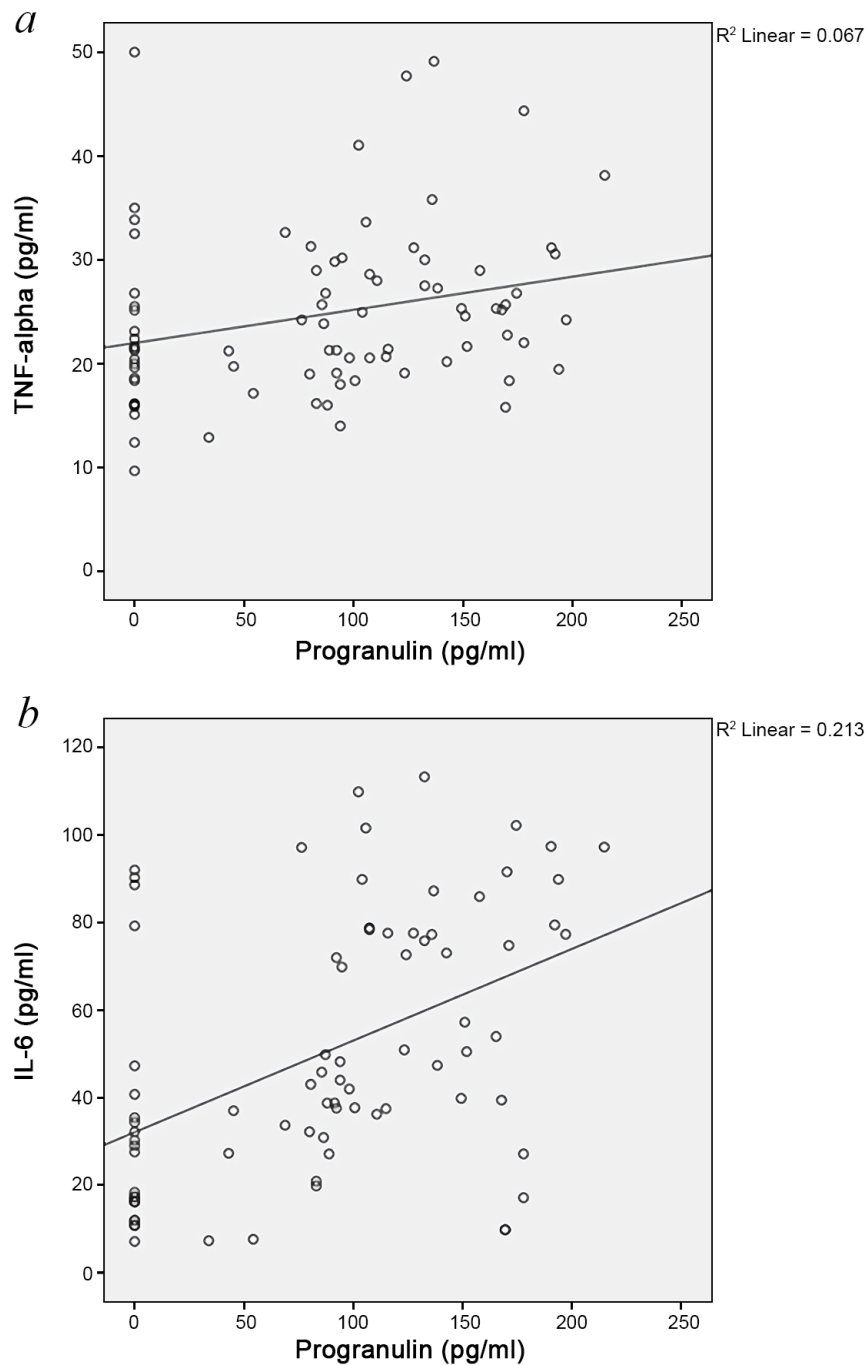


Рис. 3. *a* – Диаграмма разброса корреляции уровня програнулина и TNF- α в образцах, полученных от всех участников исследования; *b* – диаграмма разброса корреляции уровня програнулина и IL-6 в образцах, полученных от всех участников исследования

При иммунном ответе на инфекцию и повреждения тканей происходит быстрая продукция IL-6 с помощью механизмов контроля транскрипции и посттранскрипционных механизмов. Нарушение нормальной экспрессии IL-6 оказывает патологическое влияние на хронические воспалительные и аутоиммунные

процессы [15]. Принято считать, что IL-6 играет ключевую роль в цитокиновом шторме, индуцированном SARS-CoV-2, как многофункциональный медиатор воспалительных процессов, и он участвует в развитии интерстициальной пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS, acute respiratory distress

syndrome), наблюдаемых при тяжелых случаях протекания заболевания, вызванного корона-вирусной инфекцией [16]. В острой фазе инфекции при наличии воспалительного процесса продукция IL-6 у больных COVID-19 наблюдается в иммунных клетках, в особенности в Т-хэлперах тип 17 (ТН17) [17]. Кроме того, продукция IL-6 индуцируется TNF- α после высвобождения этого пирогенного цитокина из иммунных клеток в ответ на хронические воспалительные и аутоиммунные состояния, что позволяет предположить роль IL-6 в качестве ниже лежащего эффектора TNF- α [18]. Используя мета-анализ накопленных данных из 24 исследований, Wu et al. [19] изучили роль воспалительных цитокинов, включая IL-6, IL-10 и TNF- α , в тяжести протекания болезни и смертности. Они показали, что у больных COVID-19 значительно повышены уровни IL-6. В другой работе с участием больных с коронавирусной инфекцией также было показано, что по мере повышения тяжести болезни уровни IL-6 в плазме крови возрастают [20]. В нашей работе было выявлено значительное различие в уровнях TNF- α и IL-6 между больными и людьми из контрольной группы, а также между различными подгруппами больных ($p = 0,000$).

У больных COVID-19 в плазме крови также обнаруживаются повышенные уровни провоспалительных цитокинов, включая хемокины, такие как IFN- γ , IL-1 β , IP-10 и MCP-1. Кроме

того, у больных в тяжелом состоянии, направляемых в отделение интенсивной терапии, были обнаружены повышенные концентрации TNF- α [21]. В этой работе были определены уровни цитокинов и хемокинов у бессимптомных больных, больных с симптомами и выздоравливающих после COVID-19, а также здоровых людей после COVID-19, а также здоровых людей. Было показано, что уровни TNF- α выше у людей с симптомами болезни по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы [22].

Wu et al. [19] в восьми последующих работах по мета-анализу данных касательно уровня TNF- α в крови больных, тяжело переносящих COVID-19 ($n = 725$), и больных, у кого эта болезнь протекает легче ($n = 587$), показали отсутствие статистически достоверных различий между этими группами. В нашей работе мы также не смогли выявить статистически достоверных различий между уровнями TNF- α в разных группах.

PGRN является плейотропным гормоном роста и регулятором иммунной системы. Он был выявлен в эпителии, костном мозге и в различных типах иммунных клеток, таких как Т-клетки, дендритные клетки, моноциты и макрофаги [23]. Связываясь с мембраносвязанными рецепторами TNF-R1, TNF-R2 или Toll-like рецептором 9, PGRN выполняет различные функции в системах врожденного и адаптивного иммунитета. В системе адаптивного иммунитета PGRN

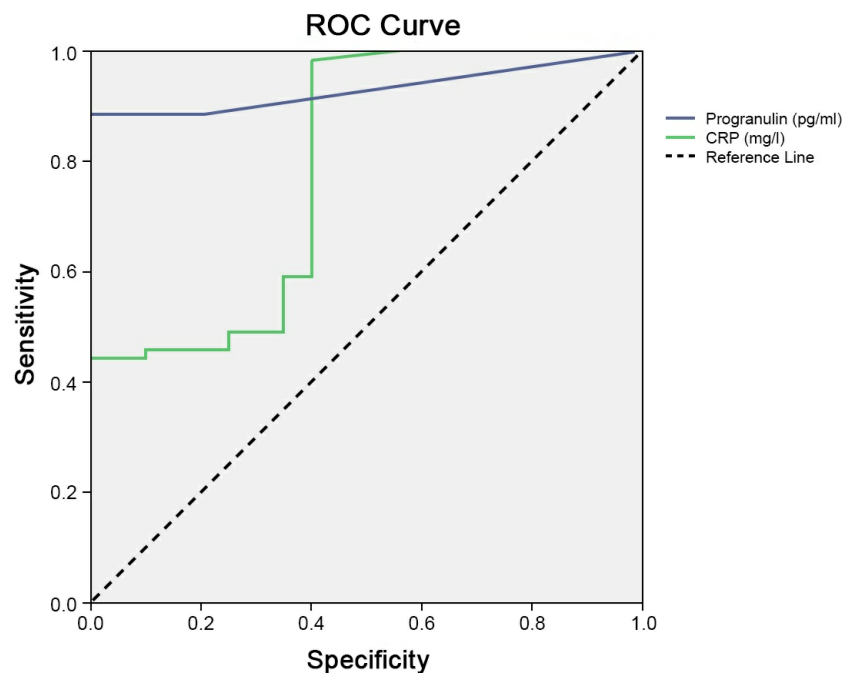


Рис. 4. ROC-кривая для програнулина и CRP (AUC = 0,931, $p = 0,000$ для програнулина; AUC = 0,791; $p = 0,000$ для CRP)

играет важную роль в Т-клеточной регуляции, способствуя превращению CD4⁺ Т-клеток в регуляторные Т-клетки Foxp (Tregs) и защищая Tregs от негативной регуляции белком TNF- α [24, 25]. PGRN препятствует проявлению цитотоксичности регуляторных NK-клеток, направленной против антивирусных Т-клеток, и ингибирует липополисахарид-опосредованную секрецию IL-6 и TNF- α макрофагами [9]. В настоящей работе нами было показано, что у больных коронавирусной инфекцией уровни PGRN значительно выше, чем у здоровых людей из контрольной группы. Когда мы брали во внимание тяжесть болезни, то мы не смогли выявить какие-либо статистически значимые различия между уровнями PGRN ($p = 0,078$). Данные по экспрессии белков в сыворотке крови больных COVID-19 описаны в литературе; не было выявлено различий в уровне экспрессии IL-6 у людей, положительных по SARS-CoV-2, при сравнении с больными со сходными симптомами и тяжестью болезни, но при этом имеющих отрицательные результаты на эту коронавирусную инфекцию. В то же время наблюдалось специфическое повышение уровня PGRN [26]. Yao et al. [27] показали, что сывороточные уровни VCAM-1 и PGRN выше у больных с COVID-19, чем у здоровых людей из контрольной группы.

В ходе определения уровня PGRN при сепсисе, внебольничной бактериальной пневмонии (CAP, community-acquired bacterial pneumonia) и COVID-19 учеными было обнаружено, что у больных COVID-19 с подтвержденной пневмонией значительно повышены уровни PGRN по сравнению с больными с внебольничной бактериальной пневмонией и с отрицательным результатом тестирования на COVID-19. Они подчеркнули, что для больных COVID-19 с подтвержденной пневмонией програнулин является даже лучшим биомаркером, чем прокальцитонин и CRP [28].

В исследованиях также было показано, что уровни CRP достигают высоких значений в начале заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией, и они являются определяющими при диагностике и прогнозе течения болезни [13, 14]. CRP является биомаркером, который используется не только для диагностики заболевания, но и для определения тяжести болезни, оценки ответа организма больного на лечение и прогнозирования вероятности летального исхода [29]. В ходе мультицентрового ретроспективного исследования Feng et al. [12] показали, что в 476 случаях уровень CRP по мере

ухудшения клинической картины повышался и достигал значительных различий для всех больных, находящихся в критическом состоянии. В результате проведенного нами ROC-анализа для оценки возможности использования PGRN в качестве биомаркера у больных COVID-19 мы определили, что этот белок имеет большее значение AUC и более статистически значимое значение p по сравнению с CRP. Таким образом, мы считаем, что PGRN может быть хорошим маркером заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией.

ВЫВОДЫ

Коронавирусная инфекция (COVID-19) признана глобальной угрозой для здоровья людей. Поэтому важно, чтобы клиницисты имели доступ к надежному экспресс-тестированию патогенов и дифференциальной диагностике, основанной на клинической идентификации во время их первого контакта с предположительными больными. В сравнении с уровнями TNF- α и IL-6, PGRN почти никогда не обнаруживался в сыворотке крови здоровых людей, и в то же время уровень этого белка был высоким у больных COVID-19. Было обнаружено, что уровень этого белка является более чувствительным маркером по сравнению с CRP при дифференцировании между больными COVID-19 и здоровыми людьми. Кроме того, низкие уровни PCT у больных COVID-19 позволяют предполагать, что повышение уровня PGRN связано с вирусной природой инфекции. Мы полагаем, что у больных коронавирусной инфекцией уровни програнулина достигают высоких значений и могут быть использованы в качестве определяющего параметра при диагностике и прогнозировании течения заболевания, и что этот белок может стать лучшим биомаркером по сравнению с CRP.

Благодарности. Авторы благодарны медицинским работникам, принимавшим участие в сборе образцов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Выполнение настоящей работы было одобрено этическим комитетом по клиническим исследованиям университета имени Ататюрка (№: B.30.2.ATA.0.01.00/411). Все случаи заболевания COVID-19 велись в соответствии с Национальным руководством.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., et al. (2020) Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019, *Nature*, **581**, 465-469.
2. Zou, S., Luo, Q., Song, Z. X., Zhang, L. P., Xia, Y., et al. (2017) Contribution of progranulin to protective lung immunity during bacterial pneumonia, *J. Infect. Dis.*, **215**, 1764-1773.
3. Dalkılıç, E., Gül, C. B., and Alkiş, N. (2012) İnterlökin-6: İnflamasyonda başrol oyuncularından, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **38**, 157-160.
4. Marshall, J. C., Murthy, S., Diaz, J., Cheng, A., Denholm, J., et al. (2020) A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research, *Lancet Infect. Dis.*, **20**, E192-E197.
5. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., et al. (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, *Nature*, **579**, 265-269.
6. Zanicco-Marani, T., Bateman, A., Romano, G., Valentinis, B., He, Z. H., et al. (1999) Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor, *Cancer Res.*, **59**, 5331-5340.
7. Anakwe, O. O., and Gerton, G. L. (1990) Acrosome biogenesis begins during meiosis – evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea-pig spermatogenesis, *Biol. Reprod.*, **42**, 317-328.
8. Jian, J. L., Konopka, J., and Liu, C. J. (2013) Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation, *J. Leukoc. Biol.*, **93**, 199-208.
9. Tang, W., Lu, Y., Tian, Q. Y., Zhang, Y., Guo, F. J., et al. (2011) The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice, *Science*, **332**, 478-484.
10. Nehring, S. M., Goyal, A., Bansal, P., and Patel, B. C. (2022) C reactive protein (CRP), *StatPearls*, PMID: 28722873.
11. Pepys, M. B., and Hirschfield, G. M. (2003) C-reactive protein: A critical update, *J. Clin. Invest.*, **111**, 1805-1812.
12. Feng, Y., Ling, Y., Bai, T., Xie, Y. S., Huang, J., et al. (2020) COVID-19 with different severities: A multicenter study of clinical features, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **201**, 1380-1388.
13. Ruan, Q. R., Yang, K., Wang, W. X., Jiang, L. Y., and Song, J. X. (2020) Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China, *Intensive Care Med.*, **46**, 1294-1297.
14. Velavan, T. P., and Meyer, C. G. (2020) Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers, *Int. J. Infect. Dis.*, **95**, 304-307.
15. Liu, B. M., Martins, T. B., Peterson, L. K., and Hill, H. R. (2021) Clinical significance of measuring serum cytokine levels as inflammatory biomarkers in adult and pediatric COVID-19 cases: A review, *Cytokine*, **142**, 155478, doi: 10.1016/j.cyto.2021.155478.
16. Buonaguro, F. M., Puzanov, I., and Ascierio, P. A. (2020) Anti-IL6R role in treatment of COVID-19-related ARDS, *J. Transl. Med.*, **18**, 165, doi: 10.1186/s12967-020-02333-9.
17. McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A., and Bridgewood, C. (2020) The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease, *Autoimmun. Rev.*, **19**, 102537, doi: 10.1016/j.autrev.2020.102537.
18. Jones, S. A., and Hunter, C. A. (2021) Is IL-6 a key cytokine target for therapy in COVID-19? *Nat. Rev. Immunol.*, **21**, 337-339.
19. Udomsinprasert, W., Jittikoon, J., Sangroongruangsri, S., and Chaikledkaew, U. (2021) Circulating levels of interleukin-6 and interleukin-10, but not tumor necrosis factor-alpha, as potential biomarkers of severity and mortality for COVID-19: Systematic review with meta-analysis, *J. Clin. Immunol.*, **41**, 11-22.
20. McElvaney, O. J., McEvoy, N. L., McElvaney, O. F., Carroll, T. P., Murphy, M. P., et al. (2020) Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **202**, 812-821.
21. Dhama, K., Pateli, S. K., Pathak, M., Yattoo, M. I., Tiwari, R., et al. (2020) An update on SARS-CoV-2/COVID-19 with particular reference to its clinical pathology, pathogenesis, immunopathology and mitigation strategies, *Travel Med. Infect. Dis.*, **37**, 101755.
22. Chi, Y., Ge, Y. Y., Wu, B., Zhang, W. S., Wu, T., et al. (2020) Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China, *J. Infect. Dis.*, **222**, 746-754.
23. Bateman, A., and Bennett, H. P. J. (1998) Granulins: The structure and function of an emerging family of growth factors, *J. Endocrinol.*, **158**, 145-151.
24. Guo, Z. L., Li, Q. C., Han, Y., Liang, Y. J., Xu, Z. G., et al. (2012) Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by progranulin, *Mediators Inflamm.*, **2012**, 540794, doi: 10.1155/2012/540794.
25. Yin, F. F., Banerjee, R., Thomas, B., Zhou, P., Qian, L. P., et al. (2010) Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice, *J. Exp. Med.*, **207**, 117-128.
26. Rieder, M., Wirth, L., Pollmeier, L., Jeserich, M., Goller, I., et al. (2021) Serum protein profiling reveals a specific upregulation of the immunomodulatory protein progranulin in coronavirus disease 2019, *J. Infect. Dis.*, **223**, 775-784.
27. Yao, S., Luo, N., Liu, J., Zha, H., Ai, Y., et al. (2021) Elevated serum levels of progranulin and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in patients with COVID-19, *J. Inflamm. Res.*, **14**, 4785-4794, doi: 10.2147/JIR.S330356.
28. Brandes, F., Borrmann, M., Buschmann, D., Meidert, A. S., Reithmair, M., et al. (2021) Progranulin signaling in sepsis, community-acquired bacterial pneumonia and COVID-19: A comparative, observational study, *Intens. Care Med. Exp.*, **9**, 1-22.
29. Gong, J., Dong, H., Xia, Q. S., Huang, Z. Y., Wang, D. K., et al. (2020) Correlation analysis между disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: A retrospective study, *BMC Infect. Dis.*, **20**, 963, doi: 10.1186/s12879-020-05681-5.

HIGH SERUM PROGRANULIN LEVELS IN COVID-19 PATIENTS: A PILOT STUDY

F. B. Özgeriş^{1*}, Ö. F. Koçak², N. Kurt³, E. Parlak⁴, N. Yüce⁵, M. S. Keleş⁶

¹ Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey; e-mail: betul.ozgeris@atauni.edu.tr

² Department of Chemistry and Chemical Process Technologies, Erzurum Vocational College, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey

³ Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Erzincan Binali Yıldırım University, Erzincan, 24002 Turkey

⁴ Department of Infection Diseases, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey

⁵ Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, 25240 Turkey

⁶ Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Uskudar University, İstanbul, 34662 Turkey

In this study, we aimed to determine whether the progranulin level in serum predicts the course and severity of the disease in COVID-19 (+) patients and whether it can be used as a biomarker in these patients. Therefore, we sampled 61 people infected with COVID-19, and the cases were divided into the following groups: asymptomatic, noncomplicated, moderate, and severe. Concentrations of progranulin, TNF- α , IL-6 from in serum obtained from all participants were measured using commercially available ELISA kits, as well as WBC, PLT, NE, LY, ALT, AST, Hb, PCT, and CRP were examined with clinical analyzer. All measurements obtained for the patient samples were compared with those of 20 healthy individuals. The serum progranulin concentration was statistically higher in the COVID-19 (+) patient group than in the control group of healthy individuals [112.6 ± 54.8 , 0.0 (0.0 - 54.2 pg/ml, respectively, $p = 0.000$)]. ROC analysis was performed to evaluate the progranulin potential as a biomarker for COVID-19 (+) patients. A larger AUC (0.931 ± 0.08) value and a more significant p -value for progranulin than for CRP ($p = 0.000$) was detected. As a result, we believe that progranulin reaches high levels in the COVID-19 disease and may be a determinant in diagnosis and prognosis, and may be a better biomarker than CRP.

Keywords: COVID-19, CRP, IL-6, progranulin