

Анализ профиля экспрессии длинных некодирующих РНК у больных с идиопатическим и COVID-19-индуцированным легочным фиброзом

Корытина Гульназ Фаритовна — д.б.н., доцент, кафедра биологии, гл.н.с., лаборатория физиологической генетики, orcid.org/0000-0002-1695-5173

Гибадуллин Иршат Асхатович — аспирант, кафедра госпитальной хирургии, orcid.org/0000-0001-9596-7342

Зулкарнеев Шамиль Рустэм-ович — студент 5 курса, лечебный факультет, orcid.org/0000-0001-6522-8530

Гимазова Алия Илнуровна — отделение торакальной хирургии, orcid.org/0000-0002-3954-2216

Маркелов Виталий Андреевич — аспирант, лаборатория физиологической генетики, м.н.с., лаборатория клеточных культур, orcid.org/0000-0002-0663-7219

Зулкарнеев Рустэм Халитович — д.м.н., профессор, кафедра пропедевтики внутренних болезней, orcid.org/0000-0002-9749-7070

Бакиров Анвар Акрамович — д.м.н., профессор, кафедра общей хирургии с курсами трансплантологии и лучевой диагностики ИДПО

Авзалетдинов Артур Марсович — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной хирургии, отделение торакальной хирургии, orcid.org/0000-0002-2435-8141

Загидуллин Науфаль Шамильевич — д.м.н., профессор, кафедра пропедевтики внутренних болезней, orcid.org/0000-0003-2386-6707

Г.Ф. Корытина^{1,2,*}, И.А. Гибадуллин¹, Ш.Р. Зулкарнеев¹, А.И. Гимазова³, В.А. Маркелов², Р.Х. Зулкарнеев¹, А.А. Бакиров¹, А.М. Авзалетдинов^{1,4}, Н.Ш. Загидуллин¹

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Россия, Республика Башкортостан, Уфа

² Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, Республика Башкортостан, Уфа

³ Государственная Новосибирская областная клиническая больница, Россия, Новосибирск

⁴ Клиника Башкирского государственного медицинского университета, Россия, Республика Башкортостан, Уфа

* **Контакты:** Корытина Гульназ Фаритовна, e-mail: guly_kory@mail.ru

Аннотация

Введение. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) является интерстициальным заболеванием легких с неясным патогенезом, быстро прогрессирующим и не имеющим эффективного лечения. Одним из самых грозных осложнений после перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 является легочный фиброз. Механизмы, которые запускают легочный фиброз и приводят к его быстрому прогрессированию, остаются в значительной степени неопределенными. Имеются данные о вкладе иммунных и генетических факторов в развитие данного заболевания. Среди последних на сегодня активно изучается роль длинных некодирующих РНК (днРНК). **Материалы и методы.** Учитывая роль днРНК TP53TG1, LINC00342, H19, MALAT1, DNM3OS и MEG3 как регуляторов сигнальных путей, связанных с активацией фибробластов и эпителиально-мезенхимального перехода, мы проанализировали уровень экспрессии выбранных днРНК в легочной ткани и мононуклеарных клетках крови больных с ИЛФ ($N = 12$), пост-COVID-19 легочным фиброзом ($N = 14$) и контрольной группе ($N = 27$). **Результаты и обсуждение.** Определены сходные паттерны экспрессии днРНК TP53TG1 и MALAT1 в мононуклеарах крови у больных с ИЛФ и пост-COVID-19 ЛФ. Уровень относительной экспрессии MALAT1 был значимо выше у больных: при ИЛФ (Fold Change = 3,207, $P = 0,0005$) и при пост-COVID-19 ЛФ (Fold Change = 9,854, $P = 0,0003$). В то время как относительный уровень экспрессии TP53TG1 был снижен: при ИЛФ (Fold Change = 0,4308, $P = 0,0313$) и при пост-COVID-19 ЛФ (Fold Change = 0,1888, $P = 0,0003$ в мононуклеарах крови, Fold Change = 0,1791, $P = 0,0237$ в легочной ткани). Повышение уровня экспрессии DNM3OS в мононуклеарах крови (Fold Change = 12,899, $P = 0,0016$) и легочной ткани (Fold Change = 9,527, $P = 0,0001$), LINC00342 (Fold Change = 2,221, $P = 0,0309$) в мононуклеарах крови было установлено только у больных ИЛФ. **Заключение.** Таким образом, оценка профиля экспрессии днРНК TP53TG1, LINC00342, MALAT1 и DNM3OS в мононуклеарах крови может быть использована в качестве информативного и неинвазивного биомаркера при ИЛФ и пост COVID-19 ЛФ.

Ключевые слова: идиопатический легочный фиброз, COVID-19-индуцированный легочный фиброз, длинные некодирующие РНК, неинвазивные биомаркеры, видеоторакоскопия, биопсия, резекция легкого

Для цитирования: Корытина Г.Ф., Гибадуллин И.А., Зулкарнеев Ш.Р., Гимазова А.И., Маркелов В.А., Зулкарнеев Р.Х., Бакиров А.А., Авзалетдинов А.М., Загидуллин Н.Ш. Анализ профиля экспрессии длинных некодирующих РНК у больных с идиопатическим и COVID-19-индуцированным легочным фиброзом. Креативная хирургия и онкология. 2023;13(4):284–291. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2023-13-4-1>

Analysis of expression profile of long non-coding RNA in patients with idiopathic and COVID-19-induced pulmonary fibrosis

Gulnaz F. Korytina^{1,2,*}, Irshat A. Gibadullin¹, Shamil R. Zulkarneev¹, Aliya I. Gimazova³, Vitaliy A. Markelov^{1,2}, Rustem Kh. Zulkarneev¹, Anvar A. Bakirov¹, Artur M. Avzaletdinov¹, Naufal Sh. Zagidullin¹

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

³ State Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Clinic of Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

* Correspondence to: Gulnaz F. Korytina, e-mail: guly_kory@mail.ru

Abstract

Introduction. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) comprises an interstitial lung disease with unclear pathogenesis, rapid progression, and no effective treatment. Pulmonary fibrosis is reported to be one of the most severe complications induced by a new coronavirus infection COVID-19. The mechanisms triggering pulmonary fibrosis and leading to its rapid progression remain substantially unclear. Evidence suggests that immune and genetic factors contribute to the development of this disease. Among the latter, the role of long non-coding RNAs (lncRNAs) has been actively studied to date. **Materials and methods.** Considering the role of TP53TG1, LINC00342, H19, MALAT1, DNMT3OS, and MEG3 lncRNAs as regulators of signaling pathways associated with fibroblast activation and epithelial-mesenchymal transition, the authors analyzed the expression level of selected lncRNAs in lung tissue and blood mononuclear cells of patients with IPF ($N = 12$), post-COVID-19 pulmonary fibrosis ($N = 14$), and in control group ($N = 27$). **Results and discussion.** Blood mononuclear cells in patients with IPF and post-COVID-19 PF revealed similar patterns of TP53TG1 and MALAT1 lncRNA expression. The level of relative expression of MALAT1 was significantly higher in patients with IPF (Fold Change=3.207, $P = 0.0005$) and with post-COVID-19 PF (Fold Change=9.854, $P = 0.0003$), while the relative expression level of TP53TG1 reduced in patients with IPF (Fold Change=0.4308, $P = 0.0313$) and with post-COVID-19 PF (Fold Change=0.1888, $P = 0.0003$ in blood mononuclear cells, Fold Change=0.1791, $P = 0.0237$ in lung tissue). Increased expression of DNMT3OS in blood mononuclear cells (Fold Change=12.899, $P = 0.0016$) and lung tissue (Fold Change=9.527, $P = 0.0001$), LINC00342 (Fold Change=2.221, $P = 0.0309$) in blood mononuclear cells was revealed only in patients with IPF. **Conclusion.** Evaluation of the lncRNA expression profile of TP53TG1, LINC00342, MALAT1 and DNMT3OS in blood mononuclei can be used as an informative and non-invasive biomarker in IPF and post COVID-19 PF.

Keywords: idiopathic pulmonary fibrosis, COVID-19-induced pulmonary fibrosis, long non-coding RNA, non-invasive biomarkers, videothoracoscopy, biopsy, lung resection

For citation: Korytina G.F., Gibadullin I.A., Zulkarneev Sh.R., Gimazova A.I., Markelov V.A., Zulkarneev R.Kh., Bakirov A.A., Avzaletdinov A.M., Zagidullin N.Sh. Analysis of expression profile of long non-coding RNA in patients with idiopathic and COVID-19-induced pulmonary fibrosis. *Creative surgery and oncology*. 2023;13(4):284–291. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2023-13-4-1>

Gulnaz F. Korytina — Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Department of Biology, Chief Researcher, Physiological Genetics Laboratory, orcid.org/0000-0002-1695-5173

Irshat A. Gibadullin — Post-graduate Student, Department of Hospital Surgery, orcid.org/0000-0001-9596-7342

Shamil R. Zulkarneev — 5th year Student, Medical Faculty, orcid.org/0000-0001-6522-8530

Aliya I. Gimazova — Thoracic Surgery Unit, orcid.org/0000-0002-3954-2216

Vitaliy A. Markelov — Post-graduate Student, Physiological Genetics Laboratory, Medical Research Assistant, Cell Culture Laboratory, orcid.org/0000-0002-0663-7219

Rustem Kh. Zulkarneev — Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of Propaedeutics of Internal Diseases, orcid.org/0000-0002-9749-7070

Anvar A. Bakirov — Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of General Surgery with Transplantology and X-ray Diagnostics Courses for Advanced Professional Education

Artur M. Avzaletdinov — Dr. Sci. (Med.), Department of Hospital Surgery, Thoracic Surgery Unit, orcid.org/0000-0002-2435-8141

Naufal Sh. Zagidullin — Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of Propaedeutics of Internal Diseases, orcid.org/0000-0003-2386-6707

ВВЕДЕНИЕ

Легочный фиброз (ЛФ) является патологическим процессом, при котором паренхима легких замещается плотной соединительной тканью, происходит избыточное разрастание межклеточного матрикса, что ведет к диффузному или очаговому уплотнению органа, нарушению его гисто- и цитоархитектоники и к функциональной недостаточности [1, 2]. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) является интерстициальным заболеванием легких с неизвестной этиологией и неясным патогенезом, быстро прогрессирующим и не имеющим эффективного лечения [3].

За последние три года с появлением новой коронавирусной инфекции (COVID-19) значительно увеличилось число больных легочным фиброзом, а также пациентов с ИЛФ. Одним из самых грозных осложнений после перенесенной COVID-19 является легочный фиброз [2, 4]. Пост-COVID-19 ЛФ характеризуется наличием стойкого легочного фиброза на компьютерных томограммах (КТ) и функциональными нарушениями после постинфекционного периода [2, 4].

Считается, что этиопатогенез и прогрессирование ИЛФ тесно связаны с постоянным повреждением легочного эпителия и эндотелия различными факторами (сигаретный дым, токсины, химические вещества, вирусы), комплексным взаимодействием различных внутриклеточных сигнальных каскадов и дисфункцией между иммунными, эпителиальными и мезенхимальными клетками после активации фибробластов [1, 5]. Поврежденные эпителиальные и эндотелиальные клетки активно экспрессируют TGF- β , который, в свою очередь, запускает TGF- β /Smad3-, Wnt/ β -catenin, PDGF-сигнальные каскады и индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) эндотелиально-мезенхимальный переход (ЭнМП). Эпителиальные и эндотелиальные клетки начинают продуцировать профиброгенные маркеры (α -гладкомышечный актин (α -SMA), фибробласт-специфический белок 1 (FSP1), коллаген 1 и фибронектин) и способны трансдифференцироваться в фиброгенные миофибробласты [1, 5]. Кроме того, пост-COVID-19 ЛФ может быть связан с активной секрецией альвеолярными макрофагами TGF- β , IL-8 и IL-1 β , что также способствует ЭМП [1].

Из-за высокой смертности от ЛФ актуальна разработка новых методов лечения, основанных на выявлении биомаркеров и знании молекулярных механизмов заболевания. Получены данные о вкладе генов *MUC5B*, *TERT*, *TERC*, *RTTEL1*, *PARN*, *SFTPC*, *SFTPA2* в развитие ИЛФ [6]. Эпигенетические механизмы регуляции, такие как метилирование и ацетилирование ДНК и гистонов, микроРНК также влияют на развитие и прогрессирование заболевания [7]. Особенный научный интерес представляют собой механизмы, так или иначе связанные с функцией длинных некодирующих РНК (днРНК), роль которых в возникновении и прогрессировании фибротических процессов в различных органах активно изучается [8]. Они представляют собой одноцепочечные РНК длиной более 200 пар оснований, осуществляющие регуляцию экспрессии генов,

транскрипции, трансляции, созревания белков и многие другие функции, в том числе благодаря связыванию и ингибированию микроРНК (миРНК), которые, в свою очередь, ингибируют мРНК [9]. Имеются данные о роли некоторых днРНК в регуляции молекулярных сигнальных путей, связанных с развитием фиброза легких [10].

Целью исследования являлся анализ экспрессионного профиля длинных некодирующих РНК, вовлеченных регуляцию процесса активации фибробластов легких, трансдифференцировку и старение эпителиальных клеток (H19, MALAT1, MEG3, DNM3OS, TP53TG1, LINC00342) в легочной ткани и мононуклеарных клетках крови больных с ИЛФ и пост-COVID-19 ЛФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в Башкирском государственном медицинском университете (Российская Федерация) в период с сентября 2022 по июль 2023 г. в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинкской декларации. В продольном проспективном нерандомизированном исследовании участвовали 52 индивида: 1 — группа с ИЛФ (n = 12), 2 — с пост-COVID-19 ЛФ (n = 14), 3 — контрольная группа (n = 27). Все пациенты были госпитализированы в отделение торакальной хирургии клиники БГМУ. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом БГМУ, протокол № 3 от 21.09.2022. Все пациенты подписывали информированное согласие для участия в исследовании.

Диагноз ИЛФ устанавливался в соответствии с клиническими рекомендациями ATS, ERS, JRS, ALAT (American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, Association Latinoamericana de Torax) [11]. Диагностическими критериями ИЛФ, согласно клиническим рекомендациям, являются признаки интерстициального легочного фиброза (пневмонии), установленные на основании результатов компьютерной томографии высокого разрешения и биопсии легочной ткани. Пациенты с пост-COVID-19 ЛФ включались в исследование в случае персистирующего фиброза и функциональной дыхательной дисфункции при отсутствии признаков воспаления (повышение уровня биомаркеров и COVID-антител в сыворотке крови) не менее чем через 6 месяцев после основного заболевания [12].

Основным малоинвазивным методом для последующего гистологического и молекулярного исследования выбрана видеоторакоскопическая краевая резекция легкого [11]. С учетом функциональной возможности подбирался однологичный наркоз. При низких показателях дыхательной функции двулегочный наркоз с карбокситораксом. Всем пациентам проводилась стандартная видеоторакоскопическая операция с получением легочной ткани из двух участков краевой резекции с помощью линейной кассеты 45 и 60 мм для исследования.

Образцы легочной ткани и крови контрольной группы были получены от 27 пациентов отделения торакальной

Параметр	Больные ЛФ		Группа сравнения (N = 27)	P
	ИЛФ (N = 12)	Пост-COVID-19 ЛФ (N = 14)		
Возраст (Mean ± SD)	52,5 ± 12,1	57,5 ± 8,026	48,46 ± 14,14	0,0547
Женщин (n, %)	9 (75,0)	8 (57,14)	19 (70,37)	0,891
Мужчин (n, %)	3 (25,0)	6 (42,86)	8 (29,63)	
Некурящие (n, %)	10 (83,33)	7 (50,0)	18 (66,66)	0,891
Курящие (n, %)	2 (16,67)	7 (50,0)	9 (33,33)	
Индекс курения у курильщиков (Mean ± SD)	30,00 ± 14,14	21,07 ± 17,55	23,06 ± 16,48	0,7446
ИМТ (Mean ± SD)	25,95 ± 5,532	27,42 ± 6,579	25,77 ± 4,311	0,5177
ОФВ1/ФЖЕЛ (%), Median (25–75 % IQR)	99,38 (70,36–105,80)	95,29 (89,65–113,80)	105,60 (83,64–113,20)	0,6588
ЖЕЛ (%), Median (25–75 % IQR)	73,80 (52,82–82,05)	85,74 (55,00–92,36)	83,21 (47,99–92,58)	0,0001
ФЖЕЛ (%), Median (25–75 % IQR)	57,00 (46,10–82,00)	81,70 (59,00–86,92)	72,10 (52,13–90,02)	0,0001

Таблица 1. Характеристика изученных групп
Table 1. Characteristics of study groups

Примечание: ИМТ — индекс массы тела, ЖЕЛ — жизненная емкость легких, ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких, ОФВ1 — объем форсированного выдоха за первую секунду, Mean ± SD — средние значения и стандартное отклонение, Индекс курения = число сигарет в день × на стаж курения в годах/20.
Notes: ИМТ: body mass index (BMI), ЖЕЛ: vital capacity of the lungs (VC), ФЖЕЛ: forced vital capacity of the lungs (FVC), ОФВ1: forced expiratory volume in the first second (FEV1), Mean±SD: mean and standard deviation, Smoking index = number of cigarettes per day X per smoking experience in years/20.

хирургии, перенесших операции по поводу травм грудной клетки, пневмоторакса. Характеристика исследуемых групп представлена в таблице 1.

В условиях стационара осуществлен сбор биологического материала для проведения исследования. Диагноз дополнительно подтверждали по результатам гистологического исследования. У всех участников исследования были собраны образцы цельной венозной крови и образцы легочной ткани, полученной после проведения трансторакальной или транстрахеальной биопсии легочной ткани, дополненной, при отсутствии противопоказаний, видеоторакоскопической биопсией легкого. Получен биоптат легочной ткани минимальными размерами и зафиксирован в растворе «Фиксатор IntactRNA» для стабилизации РНК. Изоляция мононуклеарных клеток (моноцитов и лимфоцитов) из цельной крови проводилась в градиенте плотности фиколла. Тотальная РНК выделена из мононуклеарных клеток и образцов тканей с использованием реактива и протокола TRIzol reagent, Invitrogen, UK (www.invitrogen.com) согласно протоколу производителя. Качество и количество матрицы РНК (в нг/мкл) оценивали на спектрофотометре «NanoDrop 1000» (ThermoScientific, <http://www.thermoscientific.com/en/home.html>) по поглощению при длине волны 260 нм. Качество РНК определялось анализом соотношения оптических плотностей A260/A280, которое должно находиться в интервале 1,8–2,0, также использовали значение соотношения оптических плотностей A260/A230 для выявления компонентов, содержащих фенольные кольца.

С использованием геномных баз данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) integrated database [<https://www.kegg.jp/>], TarBase v8.0 [<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/diana/web/index.php?r=tarbasev8>], Lncrna2target V3.0 [<http://bio-annotation.cn/lncrna2target/browse.jsp>] проведен предварительный биоинформационный анализ *in silico* для идентификации сети

взаимодействующих мРНК, миРНК, LncRNA, вовлеченных в ключевые сигнальные каскады, связанные с развитием легочного фиброза: активацию фибробластов легких, трансдифференцировку и старение эпителиальных клеток. По результатам поиска для анализа были выбраны следующие гены длинных некодирующих РНК: TP53TG1 (ID: 11257) (TP53 target 1), LINC00342 (ID: 150759) (long intergenic non-protein coding RNA 342), H19 (ID: 283120) (H19 imprinted maternally expressed transcript), MALAT1 (ID: 378938) (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1), DNM3OS (ID: 100628315) (DNM3 opposite strand/antisense RNA), MEG3 (ID: 55384) (maternally expressed 3).

Синтез кДНК проведен с использованием набора «MMLV RT kit» («Евроген», Россия, www.evrogen.ru) с использованием гексамерного рандомного праймера. Исследование экспрессии генов днРНК проведено на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США) в формате 96-луночных планшеты в 25 мкл реакционной смеси, содержащей специфические праймеры и целевой флуоресцентный зонд фирмы «ДНК-Синтез» (Россия) и реагенты для ПЦР «qPCRmix-HS HighROX» («Евроген», Россия). В качестве эндогенного контроля использован ген домашнего хозяйства (B2M). Относительный уровень экспрессии оценивали с помощью ddCt метода [13]. В каждую реакцию включали отрицательный контроль. В качестве референсного образца использовали образцы контрольной группы, ПЦР для каждого образца повторяли трижды.

Статистический анализ был проведен при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 9 Software (GraphPad Software, <https://www.graphpad.com>). Для представления данных использовали методы непараметрической статистики: данные представлены в виде «медиана (интерквартильный размах Q1; Q3)» или

средних и стандартного отклонения (для нормально распределенных данных). Для сравнения групп всех трех групп был применен критерий Краскела — Уоллиса, для парного сравнения групп — *U*-критерий Манна — Уитни. Уровень $p < 0,05$ считался статистически значимым. Для оценки прогностической значимости оценки уровней экспрессии проводился ROC-анализ и сравнение полученных значений площади под кривой (AUC).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено значимое снижение уровня экспрессии днРНК TP53TG1 у больных ЛФ (табл. 2). Так, в мононуклеарных клетках крови больных с ИЛФ показано снижение более чем в 2 раза (FCh = 0,4308, FR = -2,321, $P = 0,0313$) и у пост-COVID-19 ЛФ более чем в 5 раз (FCh = 0,1888, FR = -5,293, $P = 0,0003$). В легочной

ткани значимое снижение уровня экспрессии днРНК TP53TG1 более чем в 5 раз было показано у больных с пост-COVID-19 ЛФ (FCh = 0,1791 FR = -5,584, $P = 0,0237$). У больных ИЛФ также отмечено подавление экспрессии днРНК TP53TG1 в легочной ткани (FCh = 0,2617, FR = -3,821, $P = 0,3008$), но результаты были статистически не значимы (табл. 2).

С другой стороны, в группах больных ЛФ выявлено значимое повышение экспрессии днРНК MALAT1 в мононуклеарных клетках крови: у больных ИЛФ в 3 раза (FCh = 3,207, $P = 0,0005$) и пост-COVID-19 ЛФ почти в 10 раз (FCh = 9,854, $P = 0,0003$). В легочной ткани уровень экспрессии данной днРНК был сопоставим с таковым у группы сравнения.

Уровень экспрессии днРНК LINC00342 был более чем в 2 раза выше у больных ИЛФ в мононуклеарных клетках крови (FCh = 2,221, $P = 0,0309$).

днРНК	Относительная экспрессия 2 (-ΔΔCt) Больные	Относительная экспрессия 2 (-ΔΔCt) Контроль	Fold Change	Fold regulation	P
<i>пост-COVID-19 ЛФ (в мононуклеарных клетках крови)</i>					
TP53TG1	0,3037 ± 0,2068	1,705 ± 1,512	0,1888	-5,293	0,0003
LINC00342	2,092 ± 1,379	2,205 ± 2,297	0,9487	-1,053	0,5991
MALAT1	24,32 ± 32,65	2,673 ± 5,040	9,854	9,854	0,0003
H19	0,4378 ± 0,3609	1,603 ± 1,244	0,273	-3,662	0,07
DNM3OS	4,601 ± 4,854	1,630 ± 1,208	2,822	2,822	0,1862
MEG3	1,590 ± 1,121	1,947 ± 2,051	0,817	-1,224	0,8934
<i>пост-COVID-19 ЛФ (в легочной ткани)</i>					
TP53TG1	0,5116 ± 0,4172	2,857 ± 6,444	0,1791	-5,584	0,0237
LINC00342	3,496 ± 3,730	6,998 ± 17,070	0,4996	-2,002	0,8426
MALAT1	4,756 ± 7,553	2,403 ± 3,126	1,978	1,978	0,4715
H19	4,840 ± 7,835	1,399 ± 1,173	3,458	3,458	0,7957
DNM3OS	1,918 ± 3,514	1,213 ± 0,861	1,581	1,581	0,9999
MEG3	3,938 ± 7,847	1,318 ± 1,051	2,988	2,988	0,3361
<i>ИЛФ (в мононуклеарных клетках крови)</i>					
TP53TG1	0,7345 ± 0,7153	1,705 ± 1,512	0,4308	-2,321	0,0313
LINC00342	4,899 ± 4,288	2,205 ± 2,297	2,221	2,221	0,0309
MALAT1	8,575 ± 9,330	2,673 ± 5,040	3,207	3,207	0,0005
H19	1,209 ± 1,653	1,603 ± 1,244	0,7542	-1,325	0,1783
DNM3OS	21,030 ± 31,290	1,630 ± 1,208	12,899	12,899	0,0016
MEG3	9,51 ± 17,00	1,947 ± 2,051	4,887	4,887	0,528
<i>ИЛФ (в легочной ткани)</i>					
TP53TG1	0,7478 ± 0,9091	2,857 ± 6,444	0,2617	-3,821	0,3008
LINC00342	3,007 ± 4,070	6,998 ± 17,070	0,4296	-2,327	0,983
MALAT1	11,170 ± 25,500	2,403 ± 3,126	4,646	4,646	0,9999
H19	3,866 ± 5,646	1,399 ± 1,173	2,762	2,762	0,908
DNM3OS	16,390 ± 5,184	1,213 ± 0,861	9,527	9,527	<0,0001
MEG3	11,010 ± 25,930	1,318 ± 1,051	8,354	8,354	0,9615

Таблица 2. Показатели относительной экспрессии исследованных генов днРНК у больных легочным фиброзом и в контрольной группе
Table 2. Indicators of relative expression in patients with pulmonary fibrosis and in control group

Примечание: Данные относительной экспрессии (2^{-ΔΔCt}) в группах больных и контроля представлены в виде средних значений и стандартного отклонения (Mean ± SD); Fold Change (2^{-ΔΔCt} больные/2^{-ΔΔCt} контроль) — кратность изменения экспрессии у больных по сравнению с контролем; Fold Regulation — кратность снижения или увеличения уровня экспрессии у больных для величин Fold Change < 1, Fold Regulation = (-1/Fold Change); P — значимость для теста Манна — Уитни.

Notes: Relative expression data (2^{-ΔΔCt}) in the groups of patients and the control group are presented as mean values and standard deviation (Mean ± SD); Fold Change (2^{-ΔΔCt} patients/2^{-ΔΔCt} control) — fold change in expression in patients compared to the control group; Fold Regulation — fold decrease or increase in expression level in patients, for Fold Change values < 1, Fold Regulation = (-1/Fold Change); P — significance for the Mann — Whitney test.

Нами установлено значимое, в 10 и более раз, увеличение экспрессии днРНК DNM3OS в мононуклеарных клетках крови (FCh = 12,899, $P = 0,0016$) и легочной ткани (FCh = 9,527, $P = 0,0001$) больных ИЛФ.

Для днРНК со значимыми различными уровнями экспрессии в группах больных был проведен ROC-анализ. При разделении группы ИЛФ с контролем по уровню экспрессии днРНК TP53TG1 в мононуклеарных клетках крови площадь под ROC-кривой AUC = 0,7038 (95 % ДИ 0,5508–0,8568, $P = 0,0321$), оптимальная точка отсечения групп по уровню TP53TG1 составила 1,143 (чувствительность 0,818 и специфичность 0,597).

При разделении группы пост-COVID-19 ЛФ с контрольной группой по уровню днРНК TP53TG1 в мононуклеарных клетках крови AUC = 0,8403 (95 % ДИ 0,7448–0,9358, $P = 0,0006$, оптимальная точка отсечения 0,628, чувствительность = 1,0, специфичность = 0,709) и в легочной ткани AUC = 0,7279 (95 % ДИ 0,5607–0,8951, $P = 0,0241$, оптимальная точка отсечения 0,6506, чувствительность = 0,714, специфичность = 0,571).

Предиктивная значимость оценки уровня экспрессии днРНК MALAT1 в мононуклеарных клетках крови при разделении группы пост-COVID-19 ЛФ с контрольной группой составила AUC = 0,8187 (95 % ДИ 0,7005–0,9276, $P < 0,001$, оптимальная точка отсечения 2,064, чувствительность = 0,833, специфичность = 0,772); для разделения группы ИЛФ и контроля AUC = 0,8421 (95 % ДИ 0,7417–0,9425, $P = 0,001$, оптимальная точка отсечения 1,753, чувствительность = 0,889, специфичность = 0,719).

Установлена высокая прогностическая значимость оценки уровня экспрессии днРНК DNM3OS в мононуклеарных клетках крови (AUC = 0,9133, 95 % ДИ 0,7541–1,0000, $P = 0,0035$, точка отсечения 3,81, чувствительность = 1,00, специфичность = 0,933) и ткани легкого (AUC = 0,9091, 95 % ДИ 0,8022–1,0000, $P < 0,001$, точка отсечения 1,489, чувствительность = 0,90, специфичность = 0,772) для дифференциации групп ИЛФ и контрольной группы.

Для днРНК MEG3 и H19 уровень экспрессии у больных был сопоставим с таковым в контрольной группе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Легочный фиброз — заболевание, характеризующееся необратимым ремоделированием легочной интерстициальной ткани, которое сопровождается нарушением дыхательной функции. Среди заболеваний, ассоциированных с идиопатической интерстициальной пневмонией, ИЛФ является наиболее агрессивным и имеет самую высокую заболеваемость и самый плохой прогноз с медианой выживаемости 2–4 года после постановки диагноза [1, 2]. По оценке Всемирной организации здравоохранения, пандемия COVID-19 приведет к резкому росту заболеваемости ЛФ [4]. Механизмы, запускающие ЛФ и приводящие к его быстрому прогрессированию, остаются во многом неопределенными. В последние несколько лет некодирующие РНК оцениваются учеными как возможность открытия новых терапевтических стратегий и определения биомар-

керов сложных заболеваний [8, 10]. Учитывая роль днРНК TP53TG1, LINC00342, H19, MALAT1, DNM3OS и MEG3 как регуляторов сигнальных путей, связанных с активацией фибробластов и ЭМП, мы проанализировали уровень экспрессии выбранных днРНК у пациентов с ЛФ.

В настоящем исследовании нами показано, что уровень относительной экспрессии MALAT1 был значительно повышен в мононуклеарах крови больных ЛФ, а в группе больных пост-COVID-19 ЛФ наблюдалось 10-кратное увеличение экспрессии MALAT1. Результаты анализа ROC-кривых показали высокую прогностическую значимость оценки уровня экспрессии MALAT1 в мононуклеарах крови для дифференциации пациентов с ЛФ, в том числе с ИЛФ и пост-COVID-19 ЛФ, от здоровых лиц. Доказана ключевая роль MALAT1 в регуляции широкого спектра генов, вовлеченных в сигнальные пути TGF- β 1/Smad2/3-, PI3K/AKT/mTOR- и связанных с модуляцией ЭМП, воспаления в легочной ткани и воспаления при SARS-CoV-2 [14]. Вклад MALAT1 в развитие заболеваний легких в настоящее время находится в стадии изучения. Экспрессия MALAT1 была повышена в макрофагах, обработанных липополисахаридом (ЛПС), при фиброзе легких [15]. Wang et al. также наблюдали значительное повышение уровня экспрессии MALAT1 в периферической крови у пациентов с ИЛФ [16].

Нами установлено значимое снижение уровня экспрессии днРНК TP53TG1 в мононуклеарах крови и легочной ткани больных ЛФ. Наиболее выраженное снижение уровня экспрессии TP53TG1 наблюдалось у пациентов с пост-COVID-19 ЛФ. Полученные результаты ROC-анализа продемонстрировали высокую прогностическую способность оценки уровня экспрессии днРНК TP53TG1 в мононуклеарах крови для дифференциации пациентов с пост-COVID-19 ЛФ от здорового контроля. Известно, что днРНК TP53TG1 выступает в качестве проапоптотического фактора в клетках легких, участвуя в регуляции оси hsa-mir-18a-5p/PTEN [17]. Кроме того, было показано, что TP53TG1 выступает в качестве регулятора актина альфа 2 гладких мышц (ACTA2), фибронектина 1 (FN1), коллагена 1 α 1, коллагена 3 α , коллагена I [17]. Повышение экспрессии TP53TG1 снижает уровень блеомицин индуцированной экспериментальной ЛФ у мышей [18]. Результаты нашего исследования согласуются с ранее полученными данными и также демонстрируют значительное снижение экспрессии TP53TG1 у пациентов с ЛФ, что свидетельствует об участии этой днРНК в патогенезе ЛФ.

Согласно полученным результатам уровень экспрессии DNM3OS в мононуклеарах крови и легочной ткани значительно повышается у больных ИЛФ. Показана высокая диагностическая значимость оценки уровня экспрессии DNM3OS как предиктора развития ИЛФ. ДнРНК DNM3OS участвует в регуляции легочного воспаления и функционирует как профибротический и антиапоптотический фактор [19]. В то же время было показано, что DNM3OS функционирует как регулятор

SMAD-опосредованного (SMAD4, SMAD2, p-SMAD2) и SMAD-независимого (p-Akt, Akt, p-GSK-3 β , GSK-3 β) путей трансдукции профибротического сигнала, опосредованного TGF- β 1 [19]. Savary et al. продемонстрировали, что DNM3OS в фибробластах легких фрагментируется на три миРНК (miR-199a-5p, miR-199a-3p и miR-214-3p), которые связаны с сигнальным путем TGF- β [19]. DNM3OS способен регулировать взаимодействие между профибротическими TGF- β и Wnt сигнальными путями [19].

Нами установлено увеличение уровня экспрессии днРНК LINC00342 в мононуклеарах больных ИЛФ. По результатам ROC-анализа было выявлено, что уровень экспрессии LINC00342 обладает умеренной прогностической способностью для дифференциации лиц с ИЛФ (AUC = 0,7136) от здоровых индивидов. LINC00342 связывается с miR-203a-3p и подавляет антионкогенную активность белков p53 и PTEN, а miR-203a-3p функционирует как регулятор сигнального пути TGF- β /Smad3 и способствует TGF- β 1-индуцированной ЭМП [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что в нашем исследовании впервые проведен анализ экспрессии днРНК (TP53TG1, LINC00342, H19, MALAT1, DNM3OS и MEG3) в мононуклеарах периферической крови и образцах легочной ткани пациентов с пост-COVID-19 ЛФ. Установлен сходный профиль экспрессии днРНК TP53TG1 и MALAT1 в мононуклеарах периферической крови больных пост-COVID-19 ЛФ и ИЛФ. Повышение уровня экспрессии DNM3OS в мононуклеарах периферической крови и легочной ткани, а также LINC00342 в мононуклеарах периферической крови установлено только у больных ИЛФ.

Согласно полученным результатам можно предположить, что профиль экспрессии TP53TG1, LINC00342, MALAT1 и DNM3OS в мононуклеарах периферической крови и легочной ткани может быть использован в качестве информативного и неинвазивного биомаркера пост-COVID-19 ЛФ и ИЛФ. Необходимы дальнейшие исследования уровня экспрессии широкого спектра некодирующих РНК, в том числе микроРНК и днРНК, для оценки их вклада в молекулярный патогенез легочного фиброза, что в перспективе позволит увеличить эффективность диагностики и прогноза легочного фиброза различной этиологии для определения оптимальной тактики лечения.

Информация о конфликте интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

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

Sponsorship data. The study was carried out with support from the Russian Science Foundation, Contract No. 22-25-00019 dated 16.12.2021.

Благодарности. Мы выражаем благодарность всем пациентам за участие в данном исследовании.

Acknowledgments. We are grateful to all patients for their participation in this study.

Статья написана к I Евразийскому конгрессу торакальных хирургов, 11–13 декабря 2023 г., Уфа.

This article was prepared for the 1st Eurasian Congress of Thoracic Surgeons, December 11–13, 2023, Ufa.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Белевский А.С., Илькович М.М., Коган Е.А., Мерзоева З.М. и др. Идиопатический легочный фиброз: федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению. Пульмонология. 2022;32(3):473–95. DOI: 10.18093/0869-0189-2022-32-3-473-495
- 2 Giacomelli C., Piccarducci R., Marchetti L., Romei C., Martini C. Pulmonary fibrosis from molecular mechanisms to therapeutic interventions: lessons from post-COVID-19 patients. *Biochem Pharmacol.* 2021;193:114812. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114812
- 3 Richeldi L., Collard H.R., Jones M.G. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 2017;389(10082):1941–52. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30866-8
- 4 Tanni S.E., Fabro A.T., de Albuquerque A., Ferreira E.V.M., Verrastro C.G.Y., Sawamura M.V.Y., et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a narrative review. *Expert Rev Respir Med.* 2021;15(6):791–803. DOI: 10.1080/17476348.2021.1916472
- 5 Phan T.H.G., Paliogiannis P., Nasrallah G.K., Giordano R., Eid A.H., Fois A.G., et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(5):2031–57. DOI: 10.1007/s00018-020-03693-7
- 6 Michalski J.E., Schwartz D.A. Genetic risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: insights into immunopathogenesis. *J Inflamm Res.* 2021;13:1305–18. DOI: 10.2147/JIR.S280958
- 7 Tirelli C., Pesenti C., Miozzo M., Mondoni M., Fontana L., Centanni S. The genetic and epigenetic footprint in idiopathic pulmonary fibrosis and familial pulmonary fibrosis: a state-of-the-art review. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(12):3107. DOI: 10.3390/diagnostics12123107
- 8 Zhang S., Chen H., Yue D., Blackwell T.S., Lv C., Song X. Long non-coding RNAs: Promising new targets in pulmonary fibrosis. *J Gene Med.* 2021;23(3):e3318. DOI: 10.1002/jgm.3318
- 9 Zhang P., Wu W., Chen Q., Chen M. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinform.* 2019;16(3):20190027. DOI: 10.1515/jib-2019-0027
- 10 Yan W., Wu Q., Yao W., Li Y., Liu Y., Yuan J., et al. MiR-503 modulates epithelial-mesenchymal transition in silica-induced pulmonary fibrosis by targeting PI3K p85 and is sponged by lncRNA MALAT1. *Sci Rep.* 2017;7(1):11313. DOI: 10.1038/s41598-017-11904-8
- 11 Raghu G., Remy-Jardin M., Richeldi L., Thomson C.C., Inoue Y., Johkoh T., et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: an official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2022;205(9):e18–47. DOI: 10.1164/rccm.202202-0399ST
- 12 Duong-Quy S., Vo-Pham-Minh T., Tran-Xuan Q., Huynh-Anh T., Vo-Van T., Vu-Tran-Thien Q., et al. Post-COVID-19 pulmonary fibrosis: facts-challenges and futures: a narrative review. *Pulm Ther.* 2023;9(3):295–307. DOI: 10.1007/s41030-023-00226-y
- 13 Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- 14 Ghafouri-Fard S., Abak A., Talebi S.F., Shoori H., Branicki W., Taheri M., et al. Role of miRNA and lncRNAs in organ fibrosis and aging. *Biomed Pharmacother.* 2021;143:112132. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112132
- 15 Lai X., Zhong J., Zhang A., Zhang B., Zhu T., Liao R. Focus on long non-coding RNA MALAT1: Insights into acute and chronic lung diseases. *Front Genet.* 2022;13:1003964. DOI: 10.3389/fgene.2022.1003964
- 16 Wang F., Li P., Li F.S. Integrated analysis of a gene correlation network identifies critical regulation of fibrosis by lncRNAs and TFs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomed Res Int.* 2020;2020:6537462. DOI: 10.1155/2020/6537462

- 17 Xiao H., Liu Y., Liang P., Wang B., Tan H., Zhang Y., et al. TP53TG1 enhances cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells through regulating miR-18a/PTEN axis. *Cell Biosci.* 2018;8:23. DOI: 10.1186/s13578-018-0221-7
- 18 Sun J., Guo Y., Chen T., Jin T., Ma L., Ai L., et al. Systematic analyses identify the anti-fibrotic role of lncRNA TP53TG1 in IPF. *Cell Death Dis.* 2022;13(6):525. DOI: 10.1038/s41419-022-04975-7
- 19 Savary G., Dewaeles E., Diazi S., Buscot M., Nottet N., Fassy J., et al. The long noncoding RNA DNM3OS is a reservoir of fibromirs with major functions in lung fibroblast response to TGF- β and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(2):184–98. DOI: 10.1164/rccm.201807-1237OC
- 20 Fan Q., Jian Y. MiR-203a-3p regulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in asthma by regulating Smad3 pathway through SIX1. *Biosci Rep.* 2020;40(2):BSR20192645. DOI: 10.1042/BSR20192645
- 9 Zhang P., Wu W., Chen Q., Chen M. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinform.* 2019;16(3):20190027. DOI: 10.1515/jib-2019-0027
- 10 Yan W., Wu Q., Yao W., Li Y., Liu Y., Yuan J., et al. MiR-503 modulates epithelial-mesenchymal transition in silica-induced pulmonary fibrosis by targeting PI3K p85 and is sponged by lncRNA MALAT1. *Sci Rep.* 2017;7(1):11313. DOI: 10.1038/s41598-017-11904-8
- 11 Raghu G., Remy-Jardin M., Richeldi L., Thomson C.C., Inoue Y., Johkoh T., et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: an official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2022;205(9):e18–47. DOI: 10.1164/rccm.202202-0399ST
- 12 Duong-Quy S., Vo-Pham-Minh T., Tran-Xuan Q., Huynh-Anh T., Vo-Van T., Vu-Tran-Thien Q., et al. Post-COVID-19 pulmonary fibrosis: facts-challenges and futures: a narrative review. *Pulm Ther.* 2023;9(3):295–307. DOI: 10.1007/s41030-023-00226-y
- 13 Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- 14 Ghafouri-Fard S., Abak A., Talebi S.F., Shoorai H., Branicki W., Taheri M., et al. Role of miRNA and lncRNAs in organ fibrosis and aging. *Biomed Pharmacother.* 2021;143:112132. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112132
- 15 Lai X., Zhong J., Zhang A., Zhang B., Zhu T., Liao R. Focus on long non-coding RNA MALAT1: Insights into acute and chronic lung diseases. *Front Genet.* 2022;13:1003964. DOI: 10.3389/fgene.2022.1003964
- 16 Wang F., Li P., Li F.S. Integrated analysis of a gene correlation network identifies critical regulation of fibrosis by lncRNAs and TFs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomed Res Int.* 2020;2020:6537462. DOI: 10.1155/2020/6537462
- 17 Xiao H., Liu Y., Liang P., Wang B., Tan H., Zhang Y., et al. TP53TG1 enhances cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells through regulating miR-18a/PTEN axis. *Cell Biosci.* 2018;8:23. DOI: 10.1186/s13578-018-0221-7
- 18 Sun J., Guo Y., Chen T., Jin T., Ma L., Ai L., et al. Systematic analyses identify the anti-fibrotic role of lncRNA TP53TG1 in IPF. *Cell Death Dis.* 2022;13(6):525. DOI: 10.1038/s41419-022-04975-7
- 19 Savary G., Dewaeles E., Diazi S., Buscot M., Nottet N., Fassy J., et al. The long noncoding RNA DNM3OS is a reservoir of fibromirs with major functions in lung fibroblast response to TGF- β and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(2):184–98. DOI: 10.1164/rccm.201807-1237OC
- 20 Fan Q., Jian Y. MiR-203a-3p regulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in asthma by regulating Smad3 pathway through SIX1. *Biosci Rep.* 2020;40(2):BSR20192645. DOI: 10.1042/BSR20192645

REFERENCES

- 1 Avdeev S.N., Aisanov Z.R., Belevskiy A.S., Ilkovich M.M., Kogan E.A., Merzhoeva Z.M., et al. Federal clinical guidelines on diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonologiya.* 2022;32(3):473–95 (In Russ.). DOI: 10.18093/0869-0189-2022-32-3-473-495
- 2 Giacomelli C., Piccarducci R., Marchetti L., Romei C., Martini C. Pulmonary fibrosis from molecular mechanisms to therapeutic interventions: lessons from post-COVID-19 patients. *Biochem Pharmacol.* 2021;193:114812. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114812
- 3 Richeldi L., Collard H.R., Jones M.G. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 2017;389(10082):1941–52. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30866-8
- 4 Tanni S.E., Fabro A.T., de Albuquerque A., Ferreira E.V.M., Verrastro C.G.Y., Sawamura M.V.Y., et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a narrative review. *Expert Rev Respir Med.* 2021;15(6):791–803. DOI: 10.1080/17476348.2021.1916472
- 5 Phan T.H.G., Paliogiannis P., Nasrallah G.K., Giordano R., Eid A.H., Fois A.G., et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(5):2031–57. DOI: 10.1007/s00018-020-03693-7
- 6 Michalski J.E., Schwartz D.A. Genetic risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: insights into immunopathogenesis. *J Inflamm Res.* 2021;13:1305–18. DOI: 10.2147/JIR.S280958
- 7 Tirelli C., Pesenti C., Miozzo M., Mondoni M., Fontana L., Centanni S. The genetic and epigenetic footprint in idiopathic pulmonary fibrosis and familial pulmonary fibrosis: a state-of-the-art review. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(12):3107. DOI: 10.3390/diagnostics12123107
- 8 Zhang S., Chen H., Yue D., Blackwell T.S., Lv C., Song X. Long non-coding RNAs: Promising new targets in pulmonary fibrosis. *J Gene Med.* 2021;23(3):e3318. DOI: 10.1002/jgm.3318