

# Взаємозв'язок рівня монооксиду азоту з активністю фіброгенного цитокіну TGF-β1 та їхня роль у діагностиці розвитку незворотних морфофункціональних змін бронхів у підлітків, які курять

С. І. Ільченко<sup>id</sup>\*<sup>A,E,F</sup>, А. О. Фіалковська<sup>id</sup><sup>B,C,D</sup>, К. В. Скрибіна<sup>id</sup><sup>B,C</sup>

Дніпровський державний медичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

**Мета роботи** – вивчити взаємозв'язок рівня монооксиду азоту в конденсаті повітря, що видихається (FeNO), з активністю фіброгенного цитокіну TGF-β1 у сироватці крові та брашбіоптатах слизової оболонки бронхів для визначення їхньої ролі в розвитку незворотних морфофункціональних змін у підлітків, які курять.

**Матеріали та методи.** Обстежили 20 підлітків-курців із діагнозом хронічний бронхіт (ХБ), середній вік – 17,5 ± 0,2 року. Група порівняння – 37 підлітків, які курять, без респіраторних симптомів (середній вік – 15,9 ± 0,2 року) і 15 здорових осіб, які не курять (середній вік – 15,9 ± 0,4 року). У підлітків-курців оцінювали статус тютюнокуріння. Для підтвердження активного тютюнокуріння визначали метаболіт нікотину котинін у сечі. Інструментальні методи дослідження включали спірометрію, рентгенографію органів грудної порожнини, фібротрахеобронхоскопію. Концентрацію FeNO вимірювали за допомогою апарата Niox Mino. Рівень TGF-β1 визначали в сироватці крові та брашбіоптатах слизової оболонки бронхів, отриманих під час ендоскопічного дослідження.

**Результати.** Рівень FeNO вірогідно нижчий у підлітків-курців із ХБ порівняно з асимптомними підлітками (6,1 ± 0,3 ppb проти 8,8 ± 0,6 ppb, p < 0,05). Визначили взаємозв'язок між рівнем FeNO та показниками статусу тютюнокуріння у хворих на ХБ й асимптомних курців. Виявили вірогідне збільшення рівня TGF-β1 у сироватці крові хворих на ХБ порівняно з асимптомними курцями (478,7 ± 57,9 пг/мл проти 231,5 ± 23,5 пг/мл, p < 0,05). У підлітків, які курять, встановили взаємозв'язок між рівнем FeNO та підвищеною активністю фіброгенного цитокіну TGF-β (r = -0,63; p < 0,05). У третини хворих у бронхіальному ендотелії ідентифікували фактор TGF-β1. Його наявність у бронхіальному ендотелії – важливий прогностичний критерій ризику розвитку «неадекватного» пневмофіброзу, що може призводити до незворотних ремоделювальних процесів у бронхах.

**Висновки.** Визначення рівня FeNO та TGF-β1 у сироватці крові підлітків-курців має вірогідне діагностичне значення для встановлення групи ризику щодо розвитку незворотних морфофункціональних змін у бронхах, а також може сприяти підвищенню ефективності ранньої діагностики хронічної патології органів дихання.

**Ключові слова:** монооксид азоту в конденсаті повітря, що видихається (FeNO), фіброгенний цитокін TGF-β1, підлітки, які курять.

**Патологія.** 2021. Т. 18, № 2(52). С. 189-195

\*E-mail: [ilchensv@gmail.com](mailto:ilchensv@gmail.com)

## Relationship between nitric oxide levels and the activity of fibrogenic cytokine TGF-β1 and their role in diagnostics of the development of irreversible morphofunctional changes in bronchi of smoking adolescents

S. I. Ilchenko, A. O. Fialkovska, K. V. Skriabina

**The aim** is to study the relationship between the level of exhaled nitric oxide (FeNO) and the activity of the fibrogenic cytokine TGF-β1 in blood serum and brush biopsy samples of bronchial mucosa in order to determine their role in the development of irreversible morphological and functional changes in smoking adolescents.

**Materials and methods.** 20 adolescent smokers with chronic bronchitis (CB) (average age – 17.5 ± 0.2 years) were examined. The comparison group consisted of 37 adolescent smokers without respiratory symptoms (average age – 15.9 ± 0.2 years) and 15 healthy adolescents, who never smoked (average age – 15.9 ± 0.4 years). In adolescent smokers the tobacco smoking status was assessed. To confirm active smoking, the nicotine metabolite cotinine was determined in urine. Instrumental methods included spirometry, chest X-ray, tracheobronchoscopy. The FeNO level was measured using a Niox Mino. TGF-β1 level was determined in the blood serum and brush biopsy samples of the bronchial mucosa.

**Results.** The FeNO levels were significantly lower in adolescent smokers with CB in comparison with adolescent smokers without respiratory symptoms (6.1 ± 0.3 ppb versus 8.8 ± 0.6 ppb, P < 0.05). The relationship between the FeNO levels and indicators of the tobacco smoking status has been established in patients with CB and in asymptomatic smokers. There was a significant increase in the TGF-β1 levels in the blood serum in patients with CB compared with asymptomatic smokers (478.7 ± 57.9 pg/ml versus 231.5 ± 23.5 pg/ml, P < 0.05). In smoking adolescents a relationship between a FeNO level and an increased activity of the fibrogenic cytokine TGF-β (r = -0.63; P < 0.05) has been established. In one third of patients the TGF-β1 factor was identified in the bronchial endothelium. The presence of this factor in the bronchial endothelium is a serious prognostic criterion for the risk of developing “inadequate” pneumofibrosis, which can lead to irreversible remodeling processes in the bronchi.

**Conclusions.** Determination of FeNO levels and TGF-β1 in the blood serum in smoking adolescents has a reliable diagnostic value for determining the risk group for the development of irreversible morphological and functional changes in the bronchi and can improve the efficiency of early diagnosis of chronic respiratory pathology.

**Key words:** exhaled nitric oxide (FeNO), TGF-β1, adolescent, smokers.

**Pathologia** 2021; 18 (2), 189-195

**Ключевые слова:** монооксид азота в конденсате выдыхаемого воздуха (FeNO), фиброгенный цитокин TGF-β1, подростки, которые курят.

**Патология. 2021.**  
**Т. 18, № 2(52).**  
**С. 189-195**

## Взаимосвязь уровня монооксида азота с активностью фиброгенного цитокина TGF-β1 и их роль в диагностике развития необратимых морфофункциональных изменений бронхов у курящих подростков

С. И. Ильченко, А. А. Фиалковская, Е. В. Скрыбина

**Цель работы** – изучить взаимосвязь уровня оксида азота в конденсате выдыхаемого воздуха (FeNO) с активностью фиброгенного цитокина TGF-β1 в сыворотке крови и брашбиоптатах слизистой оболочки бронхов для определения их роли в развитии необратимых морфофункциональных изменений у подростков, которые курят.

**Материалы и методы.** Обследовали 20 подростков-курильщиков с диагнозом хронический бронхит (ХБ), средний возраст –  $17,5 \pm 0,2$  года. Группа сравнения – 37 подростков, которые курят, без респираторных симптомов (средний возраст –  $15,9 \pm 0,2$  года) и 15 здоровых подростков, которые не курят (средний возраст –  $15,9 \pm 0,4$  года). У подростков-курильщиков оценивали статус табакокурения. Для подтверждения активного табакокурения определяли метаболит никотина котинин в моче. Инструментальные методы исследования включали спирометрию, рентгенографию органов грудной полости, трахеобронхоскопию. Концентрацию FeNO измеряли с помощью аппарата Niox MinO. Определяли уровень TGF-β1 в сыворотке крови и брашбиоптатах слизистой оболочки бронхов, полученных при эндоскопическом исследовании.

**Результаты.** Уровень FeNO достоверно ниже у курящих подростков с ХБ по сравнению с асимптомными подростками ( $6,1 \pm 0,3$  ppb против  $8,8 \pm 0,6$  ppb,  $p < 0,05$ ). Установлена взаимосвязь между уровнем FeNO и показателями статуса табакокурения у больных ХБ и асимптомных курильщиков. Отмечено достоверное увеличение уровня TGF-β1 в сыворотке крови у больных ХБ по сравнению с асимптомными курильщиками ( $478,7 \pm 57,9$  пг/мл против  $231,5 \pm 23,5$  пг/мл,  $p < 0,05$ ). У подростков, которые курят, установлена взаимосвязь между уровнем FeNO и повышенной активностью фиброгенного цитокина TGF-β ( $r = -0,63$ ;  $p < 0,05$ ). У трети больных в бронхиальном эндотелии идентифицирован фактор TGF-β1. Его наличие в бронхиальном эндотелии – серьезный прогностический критерий риска развития «неадекватного» пневмофиброза, что может приводить к необратимым ремоделирующим процессам в бронхах.

**Выводы.** Определение уровня FeNO и TGF-β1 в сыворотке крови подростков-курильщиков имеет достоверную диагностическую значимость для определения группы риска по развитию необратимых морфофункциональных изменений в бронхах и может способствовать повышению эффективности ранней диагностики хронической патологии органов дыхания.

Хронічні захворювання органів дихання в дітей і підлітків – найскладніша й найактуальніша проблема дитячої пульмонології у зв'язку з їхньою поширеністю та соціально-економічною значущістю [1].

У структурі хронічних респираторних захворювань у дітей і підлітків одне з перших місць посідає хронічний бронхіт (ХБ) [2]. Провідну роль у патогенезі розвитку цієї патології в підлітковому віці може відігравати тютюнокуріння, оскільки органи дихання підлітків – основна мішень впливу тютюнового диму [3]. Тютюновий дим містить багато вільних радикалів, які в дихальних шляхах порушують рівновагу в системі «оксиданти – антиоксиданти» та зумовлюють розвиток оксидативного та нітрозольного стресу, гостре пошкодження легеневої тканини трансформується у хронічний запальний процес [4].

Сучасна дитяча пульмонологія прагне своєчасно діагностувати хронічні захворювання органів дихання в дітей різного віку для запобігання їхньому прогресуванню. Цим пояснюється оновлення та розширення арсеналу діагностичних методик для динамічного оцінювання функціонального стану респираторного тракту. В останні роки все більше уваги приділяють вивченню неінвазивних біомаркерів, що дають змогу диференціювати характер ураження дихальних шляхів, оцінювати їхній прогноз, а також ефективність терапії [5].

Вимірювання фракції монооксиду азоту в конденсаті повітря, що видихається (FeNO), – сучасний клініко-діагностичний метод, який поряд з основними методами визначення функціонального стану дихальних шляхів (спірометрією та пікфлоуметрією) оцінює

патофізіологічні процеси, що відбуваються в дихальних шляхах при різних захворюваннях [6]. Головна діагностична цінність рівня FeNO полягає в тому, що він здатний показати наявність і ступінь запалення в дихальних шляхах.

У результаті численних досліджень виявили загальні закономірності зміни рівня FeNO при різних патологічних станах бронхолегеневої системи. Доведено, що монооксид азоту (NO), що продукується в дихальних шляхах запальними клітинами (еозинофілами, нейтрофілами, макрофагами), – один із маркерів еозинофільного запалення дихальних шляхів, який використовують для діагностики та оцінювання ефективності базисної терапії бронхіальної астми [7,8]. Встановили також, що рівень FeNO знижується при легеневій гіпертензії, первинній циліарній дискінезії та муковісцидозі [9]. Отримали суперечливі результати досліджень рівня FeNO в дорослих при хронічному обструктивному захворюванні легень (ХОЗЛ) [10,11]. Але визначили, що тютюнокуріння та важкість перебігу захворювання – найважливіші фактори, що впливають на цей показник.

Є чимало доказів на підтвердження гіпотези про те, що вільні радикали, зокрема NO, відіграють важливу роль у розвитку фіброзу легень, підсилюючи експресію трансформуючого фактору росту β1 (TGF-β1) у легневих фібробластах [12]. TGF-β1 – один із універсальних маркерів, що діє на процеси проліферації фібробластів, синтез компонентів екстрацелюлярного матрикса та кооперацію клітин запалення. TGF-β1 є фіброгенним цитокином, що стимулює зміну структури стінки бронха, його ремоделювання. Ця морфологічна перебудова у стінці бронха призводить до розвитку незворотної

обструкції дихальних шляхів, що лежить в основі патогенезу ХОЗЛ. TGF- $\beta$ 1 відіграє надзвичайно важливу роль у розвитку легеневого фіброзу й потенційованні апоптозу бронхіальних епітеліальних клітин [13].

Отже, дослідження рівнів FeNO та TGF- $\beta$ 1 має чимале практичне значення для діагностики хронічних захворювань органів дихання. Але відомостей про дослідження рівнів FeNO та TGF- $\beta$ 1 у підлітків, які курять, у сучасній науковій літературі майже немає, а ці аспекти важливі для розуміння механізмів впливу тютюнокуріння в молодому віці на процеси формування ХБ і ХОЗЛ.

## Мета роботи

Вивчити взаємозв'язок рівня монооксиду азоту в конденсаті повітря, що видихається, з активністю фіброгенного цитокину TGF- $\beta$ 1 у сироватці крові та брашбіоптатах слизової оболонки бронхів для визначення їхньої ролі в розвитку незворотних морфофункціональних змін у підлітків, які курять.

## Матеріали і методи дослідження

Під спостереженням перебували 72 підлітки віком 14–18 років. Основна група включала 20 осіб, які курять, із діагнозом хронічний бронхіт (середній вік –  $17,5 \pm 0,2$  року); група порівняння – 37 підлітків, які курять, без респіраторних симптомів (середній вік –  $15,9 \pm 0,2$  року) і 15 здорових осіб, які не курять (середній вік –  $15,9 \pm 0,4$  року).

Критерії залучення в основну групу – вік від 14 до 18 років, діагностований ХБ у періоді ремісії основного захворювання.

Критерії виключення – наявність спадкової або вродженої патології бронхів і легень (бронхіальної астми, муковісцидозу, первинної циліарної дискінезії, дефіциту альфа-1-антитрипсину, вроджених вад розвитку бронхів і легень), діагностована гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба, імунодефіцитні стани, вроджені вади серця.

Верифікацію діагнозів рецидивний бронхіт і ХБ виконали на підставі наказу МОЗ України № 18 від 13.01.2005 р. «Про затвердження Протоколів надання медичної допомоги дітям за спеціальністю «Дитяча пульмонологія» та нової клінічної класифікації бронхітів у дітей, що ухвалена на XIII з'їзді педіатрів і затверджена МОЗ України (2016 р.).

Критерії ХБ – наявність продуктивного кашлю протягом кількох місяців упродовж 2 років, постійні різнокаліберні вологі хрипи в легенях, 2–3 загострення на рік протягом 2 років, збереження у фазі ремісії ознак порушення вентиляції легень (код за МКХ-10 – J41).

У підлітків-курців оцінювали вік початку, стаж куріння, кількість викурених за добу сигарет.

Аналіз статусу тютюнокуріння включав:

– оцінювання тютюнокуріння як фактора ризику розвитку захворювання з розрахунком індексу курця (ІК) за формулою: кількість викурених за добу сигарет  $\times 12$  місяців у році, які підліток курив (ІК  $>140$  – куріння становить ризик щодо розвитку ХОЗЛ; ІК  $>240$  – куріння неминуче призведе до розвитку ХОЗЛ);

– показник «пачка/роки» в осіб, які курили щоденно, обчислювали за формулою: кількість викурених за добу сигарет  $\times$  кількість років паління / 20;

Для підтвердження активного тютюнокуріння визначали метаболіт нікотину котинін у ранковій сечі за допомогою тест-смужок «КреативМП-котинин» (ТОВ «Производственные Био-Медицинские Технологии», Москва, РФ). Час аналізу – 5 хв, чутливість визначення (мінімальна концентрація) становить 200 нг/мл котиніну.

Інструментальні методи дослідження включали спірометрію, рентгенографію органів грудної порожнини, фібротрахеобронхоскопію (ФТБС).

Спірометричні вимірювання здійснили на сучасному спірографі MicroLab 3500 MK8 (Велика Британія) за загальноприйнятою методикою з визначенням швидкісних та об'ємних показників. Для оцінювання зворотності бронхіальної обструкції здійснювали фармакологічну пробу з сальбутамолом згідно з чинними рекомендаціями.

Рентгенографію органів грудної порожнини виконали на рентген-апараті OPERA RT20 (Італія) за стандартною методикою. Для ФТБС використовували фібробронхоскоп фірми Olympus, модель BF type MP 60 (Японія). Концентрацію FeNO визначали за допомогою апарата Niox Mino (Aerocrine, Швеція).

Матеріал для імуноцитологічного дослідження – брашбіопсії, отримані під час ендоскопічного дослідження шляхом відбитку від слизової оболонки бронхів підлітків із ХБ у періоді клінічної ремісії. Як первинні використовували моноклональні антитіла до  $\beta$ -фракції TGF (регуляторний поліпептид  $\beta$ -тип рецепторів, ліофілізат NCL-TGF- $\beta$ , фірма Novocastra). Інкубацію здійснили в камерах за температури 23–25 °C протягом 30 хвилин. Титр антитіл добирали індивідуально для кожного маркера згідно з вимогами специфікації. Антитіла розводили за допомогою спеціального розчину (antibody diluent) у співвідношенні 1:350. Після первинних антитіл – інкубація в камері до 30 хвилин, а потім промивання в буферному розчині. Ідентифікацію реакції виконали з нанесенням хромогена DAB (діамінобензидину) під контролем мікроскопа від 20 секунд до 3 хвилин. Продукт реакції мав коричневий колір із розташуванням мітки в ядрі або на мембрані. Антигенні детермінанти  $\beta$ -TGF локалізувались на мембрані, субмембранно та в цитоплазмі. Для кожного маркера здійснили контрольні дослідження, щоб не отримати псевдопозитивний або псевдонегативний результат. Для диференціації структур тканини матеріал додатково забарвлювали гематоксиліном Маєра протягом 1–3 хвилин. Паралельно аналізували ендоскопічну характеристику бронхів. Рівень сироваткового трансформуючого фактора росту  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) визначали методом імуноферментного аналізу. Використовували тест-систему «DRG TGF- $\beta$ 1 ELISA» (США).

Статистичне опрацювання результатів здійснили, використавши пакет програм Statistica 6.1 (ліцензійний № AGAR909E415822FA). Для кількісних параметрів виконали перевірку на відповідність закону Гауса за критеріями Колмогорова–Смирнова, Ліллефорса,

**Таблиця 1.** Характеристика статусу тютюнокуріння в підлітків, які курять, основної групи та групи порівняння, Ме (Q25; Q75)

Показники, одиниці вимірювання	Асимптомні курці (n = 37)	Підлітки з ХБ (n = 20)	p
Вік початку паління, роки	14,0 (13,0; 15,0)	14,0 (12,0; 14,0)	>0,05
Стаж активного тютюнокуріння, роки	2,0 (1,0; 2,0)	4,0 (3,0; 5,5)	<0,05
Кількість викурених за добу сигарет, шт.	7,0 (5,0; 10,0)	10,0 (10,0; 13,5)	<0,05
Індекс курця	84,0 (60,0; 120,0)	120,0 (120,0; 162,0)	<0,05
Показник «пачка/роки»	0,50 (0,25; 1,00)	2,00 (1,50; 3,25)	<0,05

**Таблиця 2.** Порівняння спірометричних показників у підлітків, які курять, основної групи та групи порівняння, M ± m

Показники, одиниці вимірювання	Асимптомні курці (n = 37)	Підлітки з ХБ (n = 20)	p
FEV1, %	100,3 ± 2,3	79,5 ± 2,7	<0,05
FVC, %	106,4 ± 2,3	82,0 ± 3,6	<0,05
FEV1/FVC, %	92,5 ± 1,5	98,1 ± 2,2	<0,05
PEF, %	83,3 ± 2,7	74,8 ± 3,1	<0,05

Шапіро–Вілкі. При нормальному розподілі значень параметрів визначали середнє арифметичне значення (M) і його стандартну похибку (m). Якщо розподіл відрізнявся від нормального, розраховували медіану (Me) й інтерквартильний розмах (25 %; 75 %). Оцінювали значущість відмінностей показників за допомогою критеріїв Стюдента (t) або Манна–Вітні (U). Наявність і щільність взаємозв'язків між параметрами встановлювали за результатами кореляційного аналізу Пірсона (r). Для всіх видів аналізу критичний рівень значущості (p) становив <0,05.

Для оцінювання діагностичної ефективності показників використовували ROC-аналіз із визначенням площі під ROC-кривою (AUC), за результатом визначали якість діагностичної моделі. За допомогою порогового значення розраховували чутливість, специфічність, позитивну та негативну прогностичну цінність. Під час ROC-аналізу показників визначили оптимальні порогові значення для максимальної суми чутливості та специфічності.

Дослідження здійснили з дозволу локальної комісії з питань біомедичної етики відповідно до головних морально-етичних принципів, вимог щодо дотримання прав, інтересів та особистої гідності учасників дослідження, що забезпечені нормативними документами: Гельсінською декларацією, Конвенцією Ради Європи про права людини та біомедицину, Якісною клінічною практикою (ССР), Загальною декларацією про біоетику і права людини ЮНЕСКО, Конституцією України (ст. 3, 21, 24, 28, 32), Основами законодавства України про охорону здоров'я (ст. 43.1, 44.1).

## Результати

Під час аналізу вмісту котиніну в сечі встановили: в підлітків, які курять, наявність цього метаболіту визначена у 100 % випадків. У всіх обстежених, які не курять, котинін-тест негативний.

Аналіз статусу тютюнокуріння в підлітків із груп дослідження (табл. 1) показав, що вік початку тютюнокуріння в них не відрізнявся. Але в пацієнтів із ХБ порівняно з асимптомними курцями вдвічі більший

стаж тютюнокуріння (p < 0,05), за добу вони викурили в 1,4 раза більше сигарет, ніж асимптомні курці (p < 0,05).

Оцінювання ІК і показника «пачка/роки» показало: в підлітків із ХБ ці показники вірогідно вищі, ніж в асимптомних курців (в 1,4 і 4,0 раза відповідно; p < 0,05). Відомо, що в дорослих ІК понад 140 і показник «пачка/роки» понад 10 – вірогідні фактори ризику розвитку ХОЗЛ [14]. У 30,0 % хворих на ХБ ІК перевищував 140, що надалі вказує на край високий ризик розвитку ХОЗЛ.

Результати спірометричного дослідження показали вірогідне зниження в підлітків із ХБ порівняно з асимптомними курцями середніх значень показників FEV1 (на 20,7 %; p < 0,05), FVC (на 22,9 %; p < 0,05), PEF (на 10,2 %; p < 0,05). Аналіз середніх значень показника FEV1 у підлітків із ХБ до та після проби з бронхолітиком не показав наявності вірогідних відмінностей (79,5 ± 2,7 % проти 81,3 ± 3,6 %; p > 0,05), що свідчить про незворотні зміни прохідності бронхів (табл. 2).

Результати дослідження вмісту FeNO показали: в асимптомних курців його рівень вірогідно нижчий порівняно зі здоровими підлітками, які не курять, – 8,8 ± 0,6 ppb проти 12,0 ± 0,2 ppb (p < 0,001) (рис. 1).

У підлітків із ХБ рівні FeNO вірогідно нижчі порівняно з асимптомними курцями – 6,1 ± 0,3 ppb проти 8,8 ± 0,6 ppb (рис. 1).

За допомогою ROC-аналізу визначили оптимальне порогове значення FeNO у підлітків, які курять, для діагностики ХБ – 6 ppb. Отримали такі показники діагностичної цінності: чутливість – 90,0 %, специфічність – 95,0 %, позитивне прогностичне значення – 80,0 %, негативне прогностичне значення – 94,6 %, площа під кривою (AUC) – 0,935 (95 % ДІ 0,864–1,000).

Кореляційний аналіз показав, що рівень FeNO залежить від показників статусу тютюнокуріння у хворих на ХБ та асимптомних курців: від кількості викурених за добу сигарет (r = -0,81, r = -0,72 відповідно; p < 0,01), ІК (r = -0,81, r = -0,72 відповідно; p < 0,01), показника «пачка/роки» (r = -0,85, r = -0,75 відповідно; p < 0,01).

Аналіз середніх показників рівня TGF-β1 у сироватці крові виявив вірогідне його підвищення у хворих на ХБ порівняно з асимптомними курцями (478,7 ± 57,9 пг/мл проти 231,5 ± 23,5 пг/мл; p < 0,05), що може свідчити про активність фіброзних процесів.

Імуноцитохімічний аналіз брашбіопсії слизової оболонки бронхів у підлітків із ХБ виявив виражену плоскоклітинну метapлазію бронхіального епітелію, що є ранньою ознакою ремоделінгу бронхів. У третині хворих у бронхіальному ендотелії ідентифікували фактор TGF-β1 (рис. 2). Його наявність у бронхіальному ендотелії – важливий прогностичний критерій ризику розвитку «неадекватного» фіброзу, що може призводити до незворотних ремоделювальних процесів у бронхах.

Рівень TGF-β1 у крові підлітків, які мали позитивну експресію в ендотелії бронхів, під час імуноцитохімічного аналізу вірогідно вищий, ніж у групі дітей, у котрих цей фактор не ідентифікували (736,0 ±

22,7 пг/мл та  $350,1 \pm 54,1$  пг/мл;  $p < 0,001$ ), а також порівняно з асимптомними курцями ( $231,5 \pm 23,5$  пг/мл,  $p < 0,001$ ).

За допомогою ROC-аналізу визначили оптимальне порогове значення TGF- $\beta$ 1 у крові підлітків, які курять, для діагностики ХБ – 372,9 пг/мл. Отримали такі показники діагностичної цінності: чутливість – 88,9 %, специфічність – 77,8 %, позитивне прогностичне значення – 66,7 %, негативне прогностичне значення – 77,8 %, площа під кривою (AUC) – 0,778 (95 % ДІ 0,610–0,945) (рис. 3).

Кореляційний аналіз показав сильний негативний взаємозв'язок між рівнями TGF- $\beta$ 1 і FeNO ( $r = -0,63$ ;  $p < 0,05$ ).

## Обговорення

Результати дослідження показали: тютюнокуріння впливає на рівень FeNO, вірогідно знижуючи його і в хворих на ХБ, і в респіраторно асимптомних підлітків, які курять. Встановили, що рівень FeNO залежить від показників статусу тютюнокуріння: кількості викурених за добу сигарет, ІК і показника «пачка/роки». Зниження рівня FeNO в респіраторно асимптомних підлітків, які курять, може зумовлюватися наявністю в тютюновому димі високих концентрацій активних форм кисню, що взаємодіють із NO та утворюють  $\text{NO}_3^-$ , зниженням активності NO-синтази за типом зворотного зв'язку через високий уміст оксиду азоту в тютюновому димі, а також безпосереднім токсичним ураженням NO-продукуючих клітин у курців [11]. Встановили, що при одному вдиху тютюнового диму в організм людини потрапляють майже 5000 різних хімічних сполук,  $10^{17}$  молекул вільних радикалів, а також активні форми кисню, що утворюються з NO/ $\text{NO}_2$  при взаємодії з реактивними складниками диму [15]. У хворих на ХБ зниження рівня FeNO, ймовірно, свідчить про виснаження компенсаторних механізмів його продукції.

Як відомо, NO має важливе значення в регуляції функції легень і патофізіології захворювань дихальної системи. NO – унікальна багатофункціональна молекула, що бере участь у формуванні імунного захисту, має прями протимікробний вплив, потужну антиоксидантну дію, впливає на диференціацію Т-лімфоцитів, пригнічує продукцію ІНФ- $\gamma$  тощо. У дихальних шляхах NO чинить бронходилатуючу дію, що призводить до помірного розслаблення гладких м'язів здебільшого великих бронхів, впливає на тонус легневих судин, стимулює секрецію муцину та мукоциліарний кліренс. NO регулює механізми апоптозу, що відіграє важливу роль у процесі саногенезу інфекційних захворювань респіраторного тракту [10, 15]. Спектр біологічної дії NO залежить від його концентрації. У здорових людей рівень FeNO коливається від 10 ppb до 20 ppb, якщо дотримані стандарти його вимірювання, рекомендовані Американським торакальним товариством (ATS) [16].

Оскільки NO відіграє важливу роль у механізмах биття війок, гальмування його ендогенного утворення в респіраторному тракті спричиняє порушення мукоциліарного кліренсу, розвиток мукоциліарної недостатності, виникнення мукостазу, місцевого

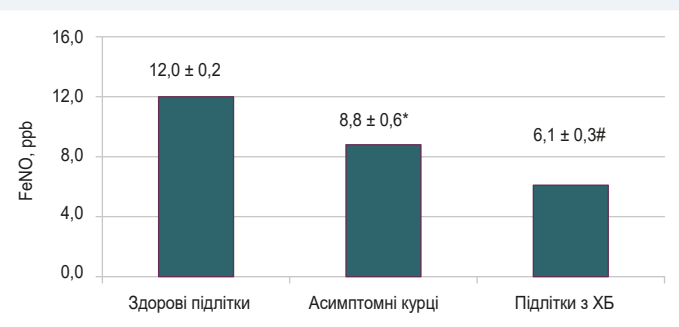


Рис. 1. Рівні FeNO (ppb) у підлітків основної групи та групи порівняння.

\*: вірогідність різниці показників здорових підлітків та асимптомних курців; #: вірогідність різниці показників асимптомних курців і підлітків із ХБ.

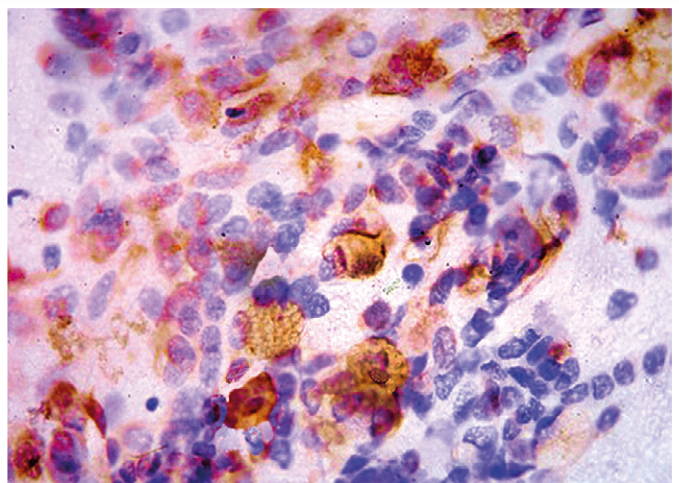


Рис. 2. Виражена позитивна мембранна та цитоплазматична реакція епітеліальних клітин бронхів із TGF- $\beta$ 1. Імуноцитологічний метод, ліофілізат NCL-TGF- $\beta$  (NovoCastra), візуалізація DAB. 36.:  $\times 1000$ .

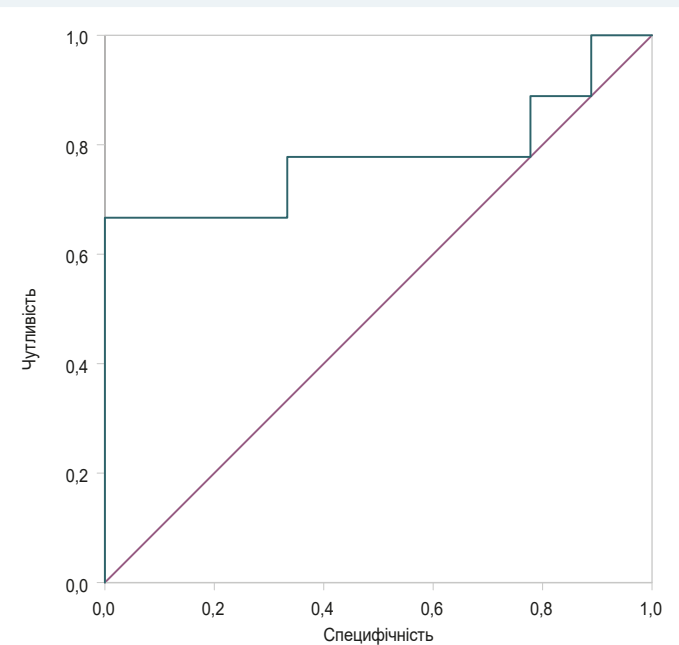


Рис. 3. ROC-крива тесту прогнозування незворотних морфофункціональних змін бронхів у підлітків-курців за рівнем TGF- $\beta$ 1 у крові.

імунодефіциту, створюючи умови для розвитку хронічної інфекції дихальних шляхів і фіксації запалення. Хронічний запальний процес респіраторного тракту супроводжується збільшенням продукції NG, NG-диметил-L-аргініну (ADMA), який є природним інгібітором NO-синтаз. Підвищення генерації ADMA призводить до зменшення вироблення NO та збільшення продукції пероксинітриту, що є біологічним маркером нейтрофільного запалення. Надлишок ADMA та зниження рівня NO індуюють синтез колагену в респіраторному тракті, зумовлюють ремоделювання бронхіальних стінок [15].

Вільні радикали, як-от NO, відіграють важливу роль у розвитку фіброзу легенів, підсилюючи експресію TGF- $\beta$ 1 у легневих фібробластах [12]. Noguchi S. et al. експериментально встановили: в мишей, які позбавлені NO-синтаз, рівень експресії IL-6, IL-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 і колагену I типу істотно вищий, ніж у мишей дикого типу, а рівень експресії антифіброзного цитокіну IFN- $\gamma$  суттєво нижчий. Отже, ступінь запальних і фіброзних змін у них також більший, ніж у тварин дикого типу [17].

Як показало наше дослідження, низькі рівні FeNO корелювали з вищими рівнями TGF- $\beta$ 1 ( $r = -0,93$ ;  $p < 0,05$ ). Визначили, що у хворих на ХБ середні показники рівня TGF- $\beta$ 1 у сироватці крові вірогідно вищі порівняно з асимптомними курцями. У третини хворих на ХБ у бронхіальному ендотелії ідентифікували фактор TGF- $\beta$ 1, який є ознакою незворотних ремоделювальних процесів у бронхах. Підвищення рівня трансформувального фактора росту в сироватці крові підлітків із ХБ має вірогідне діагностичне значення для визначення групи ризику щодо розвитку незворотних морфофункціональних змін у легенях.

Отже, результати дослідження підтверджують діагностичну значущість FeNO і TGF- $\beta$ 1 у підлітків, які курять. Визначення рівня FeNO в комплексі з основними методами оцінювання функціонального стану дихальних шляхів може сприяти підвищенню ефективності ранньої діагностики хронічної патології органів дихання в дітей і підлітків.

## Висновки

1. Рівень монооксиду азоту в конденсаті повітря, що видихається, вірогідно ( $p < 0,05$ ) нижчий у підлітків-курців із хронічним бронхітом. Імовірно, це свідчить про виснаження компенсаторних механізмів його продукції. Виявили взаємозв'язок між рівнем FeNO та показниками статусу тютюнокуріння у хворих на ХБ та асимптомних курців.

2. Визначили вірогідне збільшення рівня TGF- $\beta$ 1 у сироватці крові хворих на ХБ порівняно з асимптомними курцями ( $484,9 \pm 80,4$  пг/мл проти  $225,3 \pm 35,8$  пг/мл;  $p < 0,05$ ), що може свідчити про активність фіброзних процесів.

3. У третини хворих на ХБ у бронхіальному ендотелії ідентифікували фактор TGF- $\beta$ 1 у результаті імуногістохімічних досліджень брашбіопатів. Рівень TGF- $\beta$  у крові цих підлітків вірогідно вищий, ніж у групі хворих, в яких цей фактор не виявили ( $736,0 \pm 37,3$  пг/мл проти  $359,4 \pm 74,5$  пг/мл;  $p < 0,05$ ).

4. У групі підлітків-курців визначили взаємозв'язок між низьким рівнем монооксиду азоту в конденсаті повітря, що видихається, та підвищеною активністю фіброгенного цитокіну TGF- $\beta$  ( $r = -0,63$ ;  $p < 0,05$ ).

5. Визначення рівня FeNO та TGF- $\beta$ 1 у сироватці крові підлітків, які курять, має вірогідне діагностичне значення для встановлення групи ризику щодо розвитку незворотних морфофункціональних змін у бронхах, а також може сприяти підвищенню ефективності ранньої діагностики хронічної патології органів дихання.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у розробленні індивідуальних профілактичних програм для пацієнтів із високим ризиком хронічної бронхолегеневої патології.

## Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Дніпровського державного медичного університету «Бронхіти у дітей з коморбідними станами: клінічний перебіг та їх сучасна етіологія», № держреєстрації 01.16U004962.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 22.02.2021

Після доопрацювання / Revised: 24.05.2021

Прийнято до друку / Accepted: 05.07.2021

## Відомості про авторів:

Ільченко С. І., д-р мед. наук, професор каф. пропедевтики дитячих хвороб, Дніпровський державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-8052-8678](https://orcid.org/0000-0002-8052-8678)

Фіалковська А. О., канд. мед. наук, доцент каф. пропедевтики дитячих хвороб, Дніпровський державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-6004-8418](https://orcid.org/0000-0001-6004-8418)

Скрябіна К. В., асистент каф. пропедевтики дитячих хвороб, Дніпровський державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-9792-6269](https://orcid.org/0000-0002-9792-6269)

## Information about authors:

Ilchenko S. I., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Propedeutics of Pediatric Diseases, Dnipro State Medical University, Ukraine.

Fialkovska A. O., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Propedeutics of Pediatric Diseases, Dnipro State Medical University, Ukraine.

Skryabina K. V., Assistant of the Department of Propedeutics of Pediatric Diseases, Dnipro State Medical University, Ukraine.

## Сведения об авторах:

Ильченко С. И., д-р мед. наук, профессор каф. пропедевтики детских болезней, Днепропетровский государственный медицинский университет, Украина.

Фиалковская А. А., канд. мед. наук, доцент каф. пропедевтики детских болезней, Днепропетровский государственный медицинский университет, Украина.

Скрябина Е. В., канд. мед. наук, ассистент каф. пропедевтики детских болезней, Днепропетровский государственный медицинский университет, Украина.

## Список літератури

- [1] Динаміка захворюваності та поширеності бронхолегеневої патології у дітей / Ю. Г. Антіпкін, Н. Г. Чумаченко, В. Ф. Лапшин, Т. Р. Уманець. *Современная педиатрия*. 2016. № 2. С. 73-76. <https://doi.org/10.15574/SP.2016.74.73>

- [2] Ільченко С. І., Фіалковська А. О. Діагноз «хронічний бронхіт» в дитячій пульмонології: «за» та «проти». *Український пульмонологічний журнал*. 2018. № 4. С. 32-34.
- [3] Ільченко С. І., Фіалковська А. О. Прогнозування ризику розвитку хронічного бронхіту у підлітків-курців. *Здоров'я ребенка*. 2017. № 4. С. 29-33. <https://doi.org/10.22141/2224-0551.12.4.2017.107624>
- [4] Fischer B. M., Voynow J. A., Ghio A. J. COPD: balancing oxidants and antioxidants. *International Journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2015. Vol. 10. P. 261-276. <https://doi.org/10.2147/COPD.S42414>
- [5] Цыпленкова С. Э., Мизерницкий Ю. Л. Современные возможности функциональной диагностики внешнего дыхания у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015. Т. 60, № 5. С. 14-20.
- [6] Рогачиков А. И., Шаханов А. В., Урясьев О. М. Выдыхаемый оксид азота как дополнительный диагностический инструмент в амбулаторной практике. *Земский врач*. 2015. № 1. С. 32-36.
- [7] Чучалин А. Г. Роль оксида азота в современной клинической практике: научный доклад на V Всероссийском конгрессе «Легочная гипертензия» (13 декабря 2017 г.). *Пульмонология*. 2018. Т. 28, № 4. С. 503-511. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2018-28-4-503-511>
- [8] Turner S. W., Chang A. B., Yang I. A. Clinical utility of exhaled nitric oxide fraction in the management of asthma and COPD. *Breathe*. 2019. Vol. 15, Iss. 4. P. 306-316. <https://doi.org/10.1183/20734735.0268-2019>
- [9] Цыпленкова С. Э., Мизерницкий Ю. Л. Клиническое значение фракционного определения оксида азота в выдыхаемом воздухе как инструмента диагностики и оценки эффективности лечения хронических заболеваний органов дыхания у детей. *Пермский медицинский журнал*. 2014. Т. 31, № 2. С. 56-61.
- [10] Роль оксида азота в патофизиологии и лечении хронической обструктивной болезни легких / О. Ю. Кыткова Т. А. Гвозденко, М. В. Антонок, Т. П. Новгородцева. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2019. Т. 1, № 71. С. 105-111. [https://doi.org/10.12737/article\\_5c89ab4f8523c5.66345570](https://doi.org/10.12737/article_5c89ab4f8523c5.66345570)
- [11] Соодаева С. К., Климанов И. А., Никитина Л. Ю. Нитрозивный и оксидативный стресс при заболеваниях органов дыхания. *Пульмонология*. 2017. Т. 27, № 2. С. 262-273. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2017-27-2-262-273>
- [12] Extended Exhaled Nitric Oxide Analysis in Interstitial Lung Diseases: A Systematic Review / P. Cameli, E. Bargagli, L. Bergantini et al. *International Journal of Molecular Science*. 2020. Vol. 21, Iss. 17. P. 6187. <https://doi.org/10.3390/ijms21176187>
- [13] Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily in Obstructive Lung Diseases. More Suspects Than TGF- $\beta$  Alone / F. M. Verhamme, K. R. Bracke, G. F. Joos, G. G. Brusselle. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2015. Vol. 52, Iss. 6. P. 653-662. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0282RT>
- [14] Ільченко С. І., Фіалковська А. О. Персоніфікований підхід до профілактики тютюнокуріння у підлітків. *ScienceRise: Medical Science*. 2018. № 1(21). С. 35-38. <https://doi.org/10.15587/2519-4798.2018.121691>
- [15] Абатуров А. Е., Волосовец А. П., Юлиш Е. И. Роль прооксидантной и антиоксидантной систем при воспалительных заболеваниях органов дыхания: монография. Харьков: Планета-Принт, 2013. 496 с.
- [16] ATS/ERS Recommendations for standardized procedure for the on-line and off-line measurements of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005 / American Thoracic Society; European Respiratory Society. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005. Vol. 171, Iss. 8. P. 912-930. <https://doi.org/10.1164/rccm.200406-710ST>
- [17] Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice / S. Noguchi, K. Yatera, Ke-Y. Wang et al. *Respiratory Research*. 2014. Vol. 15, Iss. 1. P. 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0092-3>
- [5] Tsyplenkova, S. E., & Mizernitskiy, Yu. L. (2015). Sovremennyye vozmozhnosti funktsional'noi diagnostiki vneshnego dykhaniya u detei [Current possibilities of functional diagnosis of external respiration in children]. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Peditrii*, 60(5), 14-20. [In Russian].
- [6] Rogachikov, A. I. Shakhanov, A. V., & Uryasev, O. M. (2015). Vydykhaemyi oksid azota kak dopolnitel'nyi diagnosticheskiy instrument v ambulatornoj praktike [Exhaled nitric oxide as an additional diagnostic tool in ambulatory practice]. *Zemskii vrach*, (1), 32-36. [In Russian].
- [7] Chuchalin, A. G. (2018). Rol' oksida azota v sovremennoy klinicheskoy praktike: nauchnyi doklad na V Vserossiiskom kongresse «Legochnaya gipertenziya» (13 dekabrya 2017 g.) [A role of nitric oxide for the modern clinical practice: A scientific report at the 5th Pan-Russian Congress on pulmonary hypertension, December 13, 2017]. *Pulmonologiya*, 28(4), 503-511. [In Russian]. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2018-28-4-503-511>
- [8] Turner, S. W., Chang, A. B., & Yang, I. A. (2019). Clinical utility of exhaled nitric oxide fraction in the management of asthma and COPD. *Breathe*, 15(4), 306-316. <https://doi.org/10.1183/20734735.0268-2019>
- [9] Tsyplenkova, S. E., & Mizernitskiy, Yu. L. (2014). Klinicheskoe znachenie fraktsionnogo opredeleniya oksida azota v vydykhaemom vozdukhke kak instrumenta diagnostiki i otsenki effektivnosti lecheniya khronicheskikh zabolevaniy organov dykhaniya u detei [Clinical significance of expired air nitric oxide fractional determination as instrument of diagnosis and therapeutic efficiency assessment of pediatric chronic respiratory diseases]. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*, 31(2), 56-61.
- [10] Kytikova, O. Yu., Gvozdenko, T. A., Antonyuk, M. V., & Novgorodtseva, T. P. (2019). Rol' oksida azota v patofiziologii i lechenii khronicheskoy obstruktivnoy bolezni legkih [The role of nitric oxide in pathophysiology and treatment of chronic obstructive pulmonary disease]. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*, 1(71), 105-111. [In Russian]. [https://doi.org/10.12737/article\\_5c89ab4f8523c5.66345570](https://doi.org/10.12737/article_5c89ab4f8523c5.66345570)
- [11] Soodaeva, S. K., Klimanov, I. A., & Nikitina, L. Yu. (2017). Nitrozivnyi i oksidativnyi stress pri zabolevaniyakh organov dykhaniya [Nitrosative and oxidative stresses in respiratory diseases]. *Pulmonologiya*, 27(2), 262-273. [In Russian]. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2017-27-2-262-273>
- [12] Cameli, P., Bargagli, E., Bergantini, L., d'Alessandro, M., Pieroni, M., Fontana, G. A., Sestini, P., & Refini, R. M. (2020). Extended Exhaled Nitric Oxide Analysis in Interstitial Lung Diseases: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6187. <https://doi.org/10.3390/ijms21176187>
- [13] Verhamme, F. M., Bracke, K. R., Joos, G. F., & Brusselle, G. G. (2015). Transforming growth factor- $\beta$  superfamily in obstructive lung diseases. more suspects than TGF- $\beta$  alone. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 52(6), 653-662. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0282RT>
- [14] Ilchenko, S., Fialkovskaia, A. (2018). Personifikovaniy pidkhd do profilaktyky tyutunokurinnia u pidlitkiv [A personalized approach to the prevention of smoking in adolescents]. *ScienceRise: Medical Science*, (1), 35-38. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.15587/2519-4798.2018.121691>
- [15] Abaturov, A. E., Volosovets, A. P., & Yulish, E. I. (2013). *Rol' prooksidantnoi i antioksidantnoi sistem pri vospalitel'nykh zabolevaniyakh organov dykhaniya* [The role of prooxidant and antioxidant systems in inflammatory diseases of the respiratory system]. Kharkov: Planeta-Print. [In Russian].
- [16] American Thoracic Society, & European Respiratory Society (2005). ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(8), 912-930. <https://doi.org/10.1164/rccm.200406-710ST>
- [17] Noguchi, S., Yatera, K., Wang, K. Y., Oda, K., Akata, K., Yamasaki, K., Kawanami, T., Ishimoto, H., Toyohira, Y., Shimokawa, H., Yanagihara, N., Tsutsui, M., & Mukae, H. (2014). Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respiratory research*, 15(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0092-3>

## References

- [1] Antypkin, J. G., Chumachenko, N. G., Umanets, T. R., & Lapshin, V. F. (2016). Dynamika zakhvoriuvanosti ta poshyrenosti bronkholehenevoi patolohii u ditei. [The aspects of respiratory organs pathological conditions dynamics among child population]. *Sovremennaya pediatriya*, (2), 73-77. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.15574/SP.2016.74.73>.
- [2] Ilchenko, S. I., & Fialkovska, A. O. (2018). Diahnoz «khronichnyi bronkhitis» v dytiachii pulmonolohii: «za» ta «protiy». [Diagnosis "chronic bronchitis" in children's pulmonology: "pro" and "contra"]. *Ukrainskiy pulmonolohichnyi zhurnal*, (4), 32-34. [In Ukrainian].
- [3] Ilchenko, S. I., Fialkovskaya, A. O. (2017). Prohnozuvannya ryzyku rozvytku khronichnoho bronkhitu u pidlitkiv-kurtsiv [Predicting the risk of chronic bronchitis in teenage smokers]. *Zdorov'e rebenka*, (4), 29-33. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.22141/2224-0551.12.4.2017.107624>
- [4] Fischer, B. M., Voynow, J. A., Ghio, A. J. (2015). COPD: balancing oxidants and antioxidants. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 10, 261-276. <https://doi.org/10.2147/COPD.S42414>