

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-217-9-42-48>

Роль билирубина сыворотки крови в патогенезе болезни Крона у детей и оценке её активности

Федулова Э. Н.¹, Вагин М. С.¹, Хавкин А. И.²

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Минздрава России, (ул. Семашко, 22/1, г. Нижний Новгород, 603000, Россия)

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, (117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1)

Для цитирования: Федулова Э. Н., Вагин М. С., Хавкин А. И. Роль билирубина сыворотки крови в патогенезе болезни Крона у детей и оценке её активности. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2023;217(9): 42–48. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-217-9-42-48

✉ Для переписки:

Хавкин

Анатолий Ильич

gastropedclin

@gmail.com

Федулова Эльвира Николаевна, д.м.н., доцент, заведующая кафедрой педиатрии им. Ф. Д. Агафонова

Вагин Михаил Сергеевич, аспирант кафедры педиатрии им. Ф. Д. Агафонова

Хавкин Анатолий Ильич, д.м.н., профессор, руководитель Московского областного центра детской гастроэнтерологии, гепатологии; главный научный сотрудник отдела гастроэнтерологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. Ю. Е. Вельтищева МЗ РФ

Резюме

Введение. Статья посвящена выявлению маркера дисбаланса окислительного стресса и антиоксидантной системы у детей с болезнью Крона. Предложено использовать уровень общего билирубина в качестве интегративного метода оценки активности болезни Крона, основываясь на корреляции с показателями окислительного стресса и антиоксидантной системы (ишемия модифицирующий альбумин, малоновый диальдегид, каталаза, сульфгидрильные группы и глутатион).

Цель: доказать связь уровня общего билирубина и активности воспалительного процесса при болезни Крона, что позволит внедрить изучаемый интегративный показатель в клиническую практику.

Материалы и методы: в основе работы лежат результаты лабораторных исследований биомаркеров окислительного стресса (ишемия модифицирующий альбумин — ИМА плазмы, малондиальдегид — МДА плазмы) и антиоксидантной системы (SH-группы плазмы, каталаза и восстановленный глутатион эритроцитов), а также одновременное исследование уровня общего билирубина у детей с установленным диагнозом «болезнь Крона». Для поиска дифференциального метода оценки уровня активности болезни Крона по уровню билирубина применена бинарная логистическая регрессия.

Результаты и выводы: исследование показало четкую обратную связь между уровнем концентрации общего билирубина и выраженностью окислительного стресса. Установлено, что при снижении уровня общего билирубина отмечается преобладание окислительного стресса над антиоксидантной системой, что приводит к повышению активности воспаления. Доказано, что уровень общего билирубина может быть использован в комплексной оценке активности заболевания в качестве малоинвазивного, а также объективного и достоверного маркера. Чувствительность и специфичность данного метода составили 90,9% и 93,3% соответственно, что позволяет использовать показатель уровня общего билирубина в качестве маркера активности воспаления при болезни Крона.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, окислительный стресс, билирубин, роль билирубина в патогенезе БК, оценка активности воспалительного процесса при БК

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



The role of serum bilirubin in the pathogenesis of Crohn's disease in children and assessment of its activity

E. N. Fedulova¹, M. S. Vagin¹, A. I. Khavkin²

¹ Privolzhsky Research Medical University, (10/1, Minin and Pozharsky sq., Nizhny Novgorod, 603950, GSP-470, Russia)

² Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russian Federation)

For citation: Fedulova E. N., Vagin M. S., Khavkin A. I. The role of serum bilirubin in the pathogenesis of Crohn's disease in children and assessment of its activity. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2023;217(9): 42–48. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-217-9-42-48

✉ **Corresponding author:**

Anatoly I. Khavkin
gastropedclin@gmail.com

Elvira N. Fedulova, MD, PhD, DrSc (Med), Head of Department of Pediatrics named after F.V. Agafonova; ORCID: 0000–0002–1774–0692

Mikhail S. Vagin, PhD Postgraduate Student, Department of Pediatrics named after F.V. Agafonova; ORCID: 0000–0002–5988–0079
Anatoly I. Khavkin, MD, PhD, DrSci (Med), professor, head of the Moscow Regional Center of Pediatric Gastroenterology&Hepatology; chief researcher of the gastroenterology department; ORCID: 0000–0001–7308–7280

Summary

Introduction. The article is devoted to the identification of a marker of imbalance of oxidative stress and the antioxidant system in children with Crohn's disease. The putative level of total bilirubin as an integrative method for assessing Crohn's disease activity is highly correlated with indicators of oxidative stress and the antioxidant system (ischemia, modifying albumin, malondialdehyde, catalase, sulfhydryl groups and glutathione).

Purpose: to explain the relationship between the level of total bilirubin and the activity of the inflammatory process in Crohn's disease, which allows the introduction of the studied integrative indicator in clinical practice.

Materials and methods. Based on the results of scientific studies of biomarkers of oxidative stress (albumin-modifying ischemia — plasma IMA, malondialdehyde — plasma MDA) and the antioxidant system (plasma SH-groups, catalase and reduced erythrocyte glutathione), as well as a simultaneous study of the level of total bilirubin in children diagnosed with Crohn's disease. To search for a differential method for assessing the level of Crohn's disease activity by the degree of bilirubin, use binary logistic regression.

Results and survey. The results of the study showed a clear relationship between the increase in bilirubin levels and the severity of oxidative stress. It has been established that with a decrease in the level of total bilirubin, there is a predominance of oxidative stress over the antioxidant system, which leads to an increase in inflammation activity. It has been proven that the level of total bilirubin can be used in the complex activity of diseases as a minimally invasive, as well as an objective and acute marker. The sensitivity and specific sensitivity of this protocol is 90.9% and 93.3% respectively, which allows the use of total bilirubin as a marker of inflammation in Crohn's disease.

Keywords: inflammatory bowel disease, Crohn's disease, oxidative stress, bilirubin, role of bilirubin in CD, assessment of inflammatory activity in CD

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

Введение

Болезнь Крона (БК) представляет собой хроническое сложно курируемое заболевание, для которого характерно трансмуральное поражение любого отдела желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также многочисленные внекишечные проявления [1]. Помимо того, что БК, по сути, группа фенотипически схожих заболеваний, характеризующихся полиорганым поражением с преимущественной

локализацией патологического процесса в ЖКТ, высказано мнение, что БК у детей и БК взрослых — этиологически разные заболевания [2].

Так, у детей изучаемая патология имеет ряд особенностей:

- характеризуется более обширным поражением и агрессивным течением [3], что, наряду со свищевой и стриктурирующей формами, требует

более интенсивного лечения, в том числе, хирургического [4];

- требует от клиницистов более тонкой дифференциальной диагностики, как внутригрупповой с язвенным колитом (ЯК), так и межгрупповой с такими состояниями, как первичные иммунодефициты, клостридиальная инфекция, системные болезни соединительной ткани, системные васкулиты, моно- и полигенные аутовоспалительные заболевания, что, в первую очередь, обусловлено общими механизмами патогенеза [5].

Еще одну трудность для врача представляет оценка активности болезни Крона. В настоящее время ни один из предложенных малоинвазивных методов не смог приблизиться по достоверности к эндоскопическим и морфологическим характеристикам. В связи с тем, течение болезни Крона у детей очень вариабельно и требует регулярного контроля, особенно при решении вопроса смены терапевтической тактики, оценка активности должна проводиться неинвазивными методами на регулярной основе [6].

Таким образом, перед исследователями встает непростая задача поиска безопасного, точного, неинвазивного и, самое главное, патофизиологически обоснованного метода оценки активности БК у детей. В настоящее время используется определение индекса активности – Pediatric Crohn's Disease Activity Index – PCDAI, который включает в себя оценку клинических и лабораторных признаков и даёт возможность определить имеет ли место ответ на терапию при регулярной оценке индекса [7]. Однако, данный метод имеет свои недостатки: оценка клинических признаков активности заболевания достаточно субъективна, исключает показатели воспалительной и эндоскопической активности. Кроме того, исследование статично – изменения многих показателей индекса можно оценить лишь с разницей в несколько месяцев.

В контексте вышесказанного, объективным способом оценки активности БК может стать оценка биомаркеров свободнорадикальной энергии.

Материалы и методы

Выборку составили 26 пациента (50%) с диагнозом «болезнь Крона», из которых в группу с умеренной активностью (на основе клиничко-эндоскопических показателей) входило 11 больных и в группу с высокой активностью (на основе клиничко-эндоскопических показателей) – 15 больных. Диагноз каждого ребенка был установлен до момента исследования, его верификация проводилась в комплексе обследований, включающих клиничко-лабораторные, эндоскопические и морфологические данные. У пациентов не было сопутствующей патологии, которая могла повлиять на уровень билирубина, кроме как анемия хронических заболеваний, а также отсутствовала значимая разница между соотношением прямой и непрямой фракции.

В основе работы лежат результаты лабораторных исследований биомаркеров окислительного

Доказано, что дисбаланс про- и антиоксидантов при любом хроническом воспалении реализуется в виде окислительного стресса (биомаркеры окислительного стресса – ишемия модифицирующий альбумин – ИМА плазмы, малондиальдегид – МДА плазмы и антиоксидантной системы – SH-группы плазмы, каталаза и восстановленный глутатион эритроцитов), который будет приводить к порочному кругу роста активности воспаления [8].

Возникает законный вопрос: какие именно маркеры выбрать для интегративной оценки активности воспаления? Таким субстратом может стать билирубин, который входит в клинический минимум обследования на каждом этапе лечения пациента.

На протяжении многих лет билирубин рассматривался как конечный продукт катаболизма гема, обладающий токсическими свойствами. К настоящему времени нормальные физиологические концентрации (3–21 мкмоль/л) данного пигмента считают жизненно необходимыми [9]. Установлено, что билирубин способен предотвращать окисление альбумин-связанных жирных кислот, а также и самого белка, что вполне сопоставимо с активностью известных ранее природных антиоксидантов [10, 11].

Основным механизмом развития гипобилирубинемии является снижение уровня его источника – гема. Тем самым развитие анемии хронических заболеваний при БК, тяжесть которой коррелирует с активностью заболевания, является еще одним доказанным патофизиологическим путем развития окислительного стресса.

Обобщая вышесказанное, в основу исследования легла научная гипотеза, что уровень общего билирубина может коррелировать с активностью воспалительного процесса и окислительным стрессом при БК, а это, в свою очередь, можно использовать на практике для решения вопроса о контроле за течением заболевания.

Цель работы – доказать связь уровня общего билирубина и активности воспалительного процесса при болезни Крона, что позволит внедрить изучаемый интегративный показатель в клиническую практику.

стресса (ишемия модифицирующий альбумин – ИМА плазмы, малондиальдегид – МДА плазмы) и антиоксидантной системы (SH-группы плазмы, каталаза и восстановленный глутатион эритроцитов), а также одновременное исследование уровня общего билирубина у детей с установленным диагнозом «болезнь Крона» и получающих лечение в 1 педиатрическом отделении Института педиатрии Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. От родителей всех детей (или от самих детей старше 15 лет) получено информированное согласие на участие в исследовании.

Статистический анализ проводился с помощью компьютерной программы для статистической обработки данных – SPSS Statistics версия 23.0. С целью обобщения показателей окислительного стресса и антиоксидантной системы для каждого пациента рассчитан средний показатель окислительного

стресса по формуле (ИМА+МДА-SH-группы-GSH-каталаза)/5. Принадлежность выборки к закону распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка, который для исследуемых групп составил более 0,05 и коэффициентов асимметрии и эксцесса. Данные описаны средним и среднеквадратичным отклонением $M \pm SD$. Первоначально результаты исследования обработаны методами параметрической статистики с применением t-критерия Стьюдента с учетом равенства дисперсий с целью доказательства наличия значимой разницы в уровнях билирубина в группах

высокой и умеренной активности заболевания. Для решения задачи соотношения уровня общего билирубина и уровня окислительного стресса использовалась линейная регрессия с зависимой переменной – коэффициент окислительного стресса, а не зависимой – уровень общего билирубина. Для поиска дифференциального метода оценки уровня активности болезни Крона по уровню билирубина применена бинарная логистическая регрессия. Оценка качества полученной модели и поиск оптимального порога классификации были проведены с помощью построения ROC-кривой.

Результаты исследования

Сравнив данные показатели в группах умеренной и высокой активности болезни Крона, получено, что в группе высокой активности показатель окислительного стресса статистически выше, чем в группе с умеренной активностью ($p < 0,0001$) [рис. 1].

При оценке различий уровня общего билирубина между группами высокой и умеренной активности болезни Крона t-критерием Стьюдента определяется статистически значимая разница ($p < 0,0001$), что наглядно показано на графике box plot [рис. 2].

С целью обнаружения связи между уровнем общего билирубина и показателем окислительного стресса построена модель линейной регрессии, где зависимая переменная – это ранее подсчитанный коэффициент окислительного стресса, а независимая – уровень общего билирубина (таблица 1). Получено уравнение: коэффициент

окислительного стресса = $-2,331 \times$ концентрацию общего билирубина $-45,211$. Для того, чтобы доказать работоспособность данной модели случайным образом подставим в уравнение показатель общего билирубина у пациента группы высокой активности и пациента группы умеренной активности БК и сравним полученное число с их коэффициентом окислительного стресса.

Пример 1 (уровень общего билирубина равен 14,5 мкмоль/л, коэффициент окислительного стресса $-79,72$): коэффициент окислительного стресса = $-2,331 \times 14,5 - 45,211 = -79,01$, данный пример демонстрирует, что нормальный уровень общего билирубина коррелирует с низким уровнем окислительного стресса.

Пример 2 (уровень общего билирубина равен 4,7 мкмоль/л, коэффициент окислительного стресса $-54,14$): коэффициент окислительного стресса

Рисунок 1. Уровни коэффициента окислительного стресса при умеренном и высоком уровне активности болезни Крона

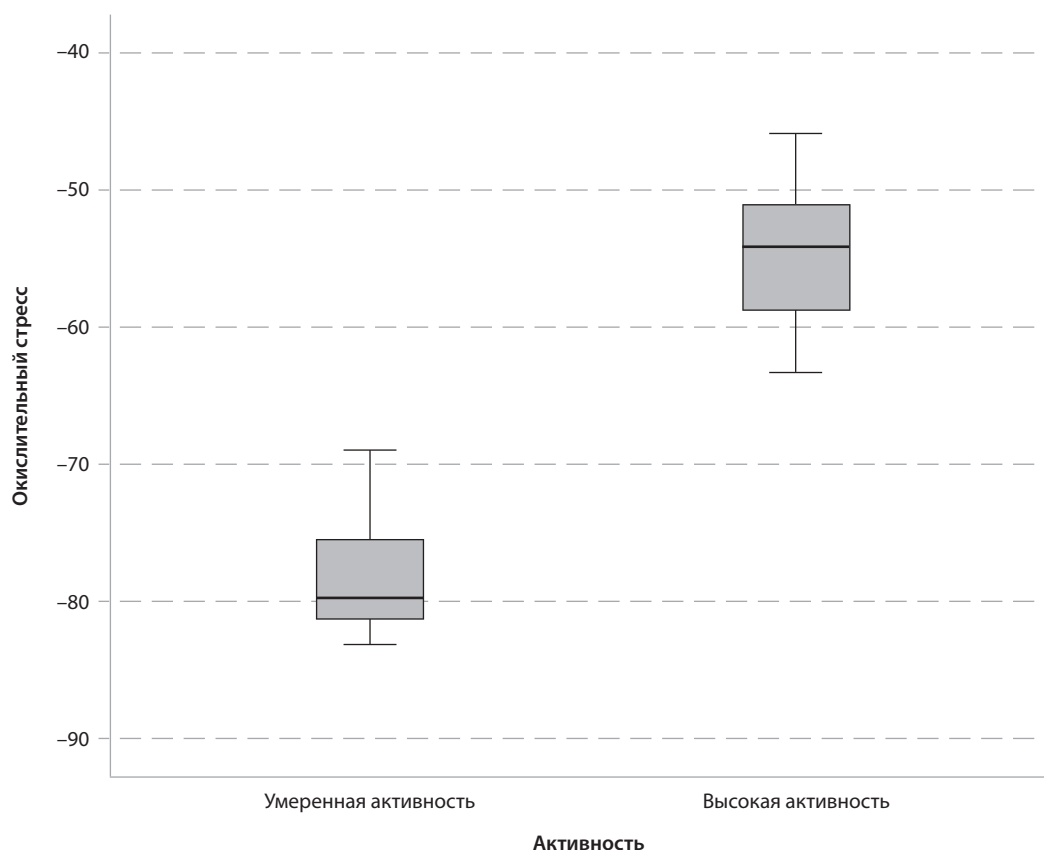


Рисунок 2.
Разница концен-
траций общего
билирубина между
группами умерен-
ной и высокой ак-
тивности болезни
Крона

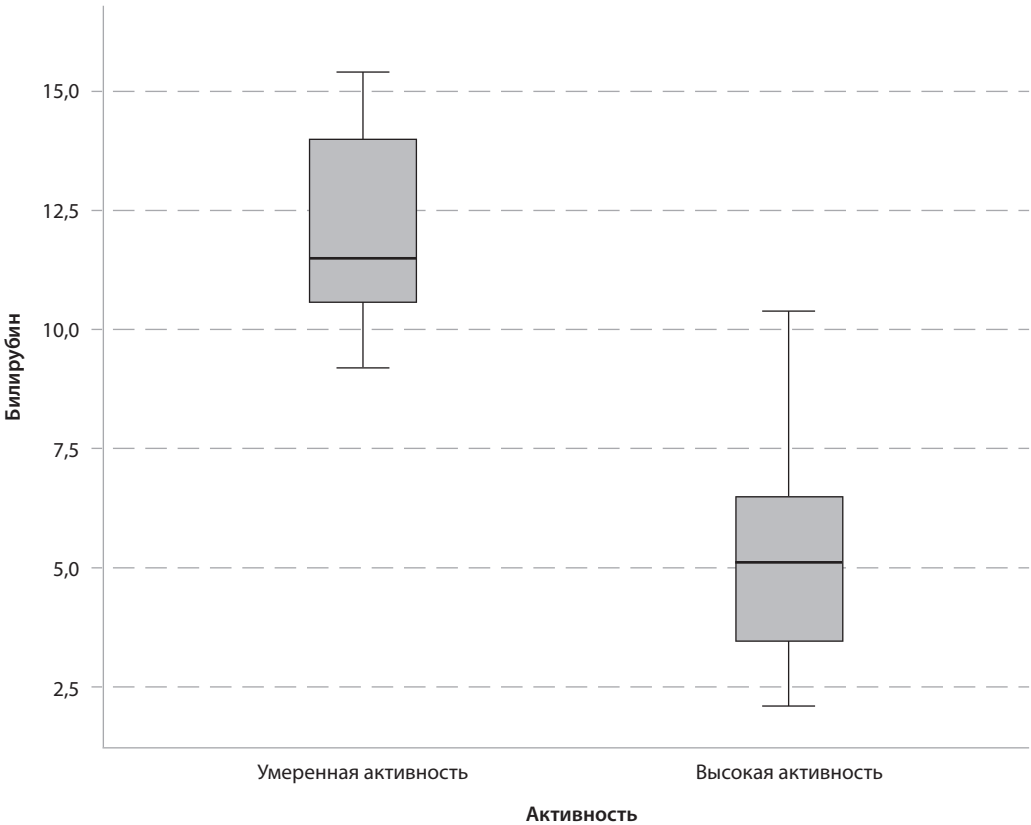


Таблица 1.
Коэффициенты
линейной ре-
грессии, которая
описывает связь
между уровнем
общего билируби-
на и активностью
окислительного
стресса

Модель	Нестандартизованные коэффициенты		Стандартизованные коэффициенты	t	Значимость
	B	Стандартная ошибка	Бета		
Константа	-45,211	3,880		-11,652	0,0001
Общий билирубин	-2,331	0,423	-0,748	-5,513	0,0001

Таблица 2.
Результаты оценки
уровня активности
болезни Крона по
уровню общего
билирубина

Уровень активности	Прогнозируемая активность		Всего	Правильный прогноз (%)
	Умеренная	Высокая		
Умеренная	10	1	11	90,9%
Высокая	1	14	15	93,3%
Всего	11	15	26	92,3%

$= -2,331 \times 4,7 - 45,211 = -56,2$, доказывает связь низкого уровня общего билирубина и высокого показателя окислительного стресса. Таким образом, данная модель доказывает, что имеет место четкая обратная связь между уровнем концентрации общего билирубина и окислительным стрессом при таком воспалительном процессе, как болезнь Крона. И, что более важно, общий билирубин в средних

нормальных значениях действительно является антиоксидантом при хронических воспалительных заболеваниях.

Учитывая значимую разницу уровня общего билирубина в группах высокой и умеренной активности болезни Крона, рациональным будет рассчитать логистическую регрессию для решения задачи определения активности заболевания.

$y = -1,524 \times \text{общий билирубин} + 14,398$, где y – регрессионная функция,

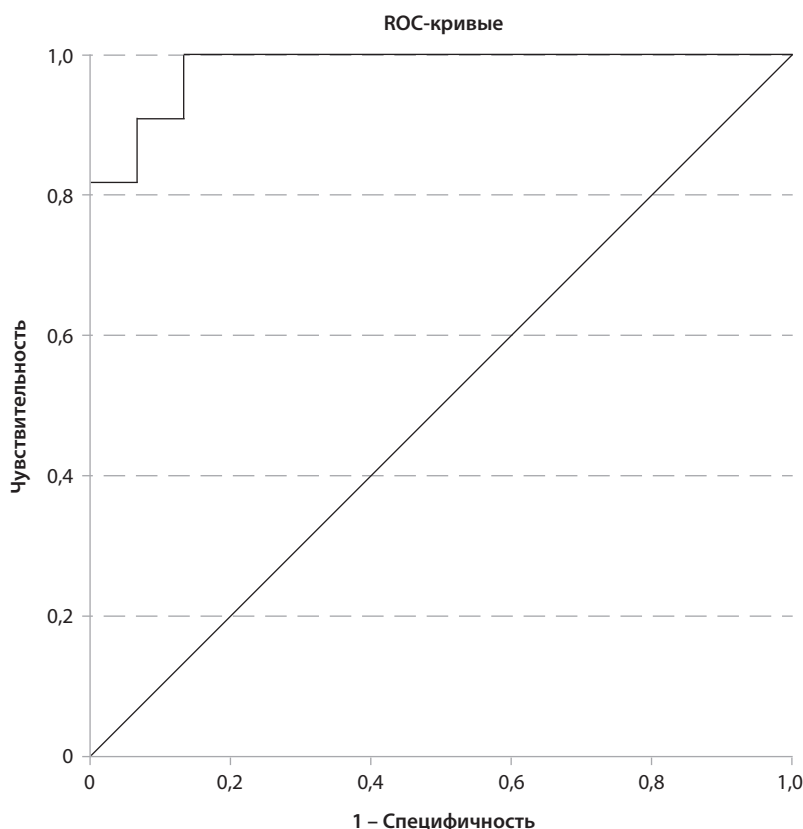
Вероятность наличия у пациента тяжелого течения БК определяется по формуле: $P = 1 / (1 + e^{-y})$, где y – регрессионная функция.

Чувствительность полученной модели составила 90,9%, а специфичность 93,3% (табл. 2).

Построение характеристической кривой (рис. 3) позволило уточнить значение cut-off – 9,65 мкмоль/л (таким образом, при уровне билирубина

ниже этого уровня можно судить о высокой активности болезни Крона) и подтвердило высокий уровень специфичности и чувствительности – 90,9% и 93,3% соответственно. Полученные параметры ROC-кривой характеризуют модель как отличную (AUC=0,982; стандартная ошибка – 0,02; асимптотическая значимость <0,00001; асимптотический доверительный интервал – 0,943–1).

Рисунок 3.
ROC-кривая модели оценки активности болезни Крона по уровню общего билирубина



Обсуждение полученных результатов и выводы

БК представляет собой хроническое гранулематозное воспалительное заболевание. Патогенез данной патологии сложен и включает в себя множество аспектов. Одним из них является преобладание активных форм кислорода над антиоксидантной системой, что усугубляет течение воспаления. Знание данных фактов открывает окно возможности для поиска диагностических и терапевтических целей БК и других хронических воспалительных заболеваний. Билирубин является основным метаболическим конечным продуктом деградации гема. Несмотря на действие в качестве цитотоксического метаболита в высоких концентрациях, билирубин в физиологиче-

ских концентрациях оказывает антиоксидантное действие, такое как удаление активных форм кислорода, что приводит к снижению окислительного стресса.

Таким образом, результаты проведенного исследования доказывают роль билирубина как антиоксиданта, который в субнормальных значениях влияет на активность заболевания в целом. При низких значениях уровня общего билирубина отмечается высокая активность заболевания. Также, нами рассчитан уровень общего билирубина, при котором можно определить степень активности заболевания в данный момент времени, что применимо в клинической практике.

Литература | References

1. Yablokova E. A., Dzhabarova A. K., Lokhmatov M. M., Gorelov A. V., Krutikhina S. B., Erokhina M. I., Chibrina E. V., Rimskaya A. M., Khavkin A. I. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel diseases in children, a modern view of the problem. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2023;209(1): 165–177. (In Russ.) doi: 10.31146/1682–8658-ecg-209–1–165–177.
2. Moazzami B., Moazzami K., Rezaei N. Early onset inflammatory bowel disease: manifestations, genetics and diagnosis. *Turk J Pediatr*. 2019;61(5):637–647. doi: 10.24953/turkjped.2019.05.001.
3. Fuller M. K. Pediatric Inflammatory Bowel Disease: Special Considerations. *Surg Clin North Am*. 2019 Dec;99(6):1177–1183. doi: 10.1016/j.suc.2019.08.008. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31676056.
4. Dotlačil V., Škába R., Rousková B., Poš L., Kučerová B., Coufal Š., Lerchová T., Rygl M. Surgical treatment of Crohn's disease in children in the era of biological treatment. *Rozhl Chir*. 2022 Winter;101(2):56–60. English. doi: 10.33699/PIS.2022.101.2.56–60.
5. Petagna L., Antonelli A., Ganini C. et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. *Biol*

- Direct.* 2020 Nov 7;15(1):23. doi: 10.1186/s13062-020-00280-5.
6. Budkina T. N., Lokhmatov M. M., Tupylenko A. V., Oldakovsky V. I., Korolev G. A., Yablokova E. A., Khavkin A. I. Clinical guidelines for endoscopic diagnosis and monitoring of Crohn's disease in children (Draft). *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2023;209(1): 87–97. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-209-1-87-97.
Будкина Т. Н., Лохматов М. М., Тупыленко А. В., Олдаковский В. И., Королёв Г. А., Яблокова Е. А., Хавкин А. И. Клинические рекомендации по эндоскопической диагностике и мониторингу болезни Крона у детей (проект). *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2023;209(1): 87–97. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-209-1-87-97.
 7. Turner D., Griffiths A. M., Walters T. D. et al. Mathematical weighting of the pediatric Crohn's disease activity index (PCDAI) and comparison with its other short versions. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2012; 18 (1): 55–62. doi: 10.1002/ibd.21649.
 8. Zimmerman L., Bousvaros A. The pharmacotherapeutic management of pediatric Crohn's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2019 Dec;20(17):2161–2168. doi: 10.1080/14656566.2019.1659778.
 9. Chen S., Wu X., Yu Z. Juglone Suppresses Inflammation and Oxidative Stress in Colitis Mice. *Front Immunol.* 2021 Aug 5;12:674341. doi: 10.3389/fimmu.2021.674341.
 10. Vitek L. The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. *Front Pharmacol.* 2012 Apr 3;3:55. doi: 10.3389/fphar.2012.00055.
 11. Wegiel B., Otterbein L. E. Go green: the anti-inflammatory effects of biliverdin reductase. *Front Pharmacol.* 2012 Mar 16;3:47. doi: 10.3389/fphar.2012.00047.