

НЕИНВАЗИВНЫЕ БИОМАРКЕРЫ: ЦИТРУЛЛИН И ИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДИАГНОСТИКИ И КОНТРОЛЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА

© Шаповалова Н.С.

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2.

Резюме. В данной статье рассматриваются клинические и лабораторные исследования. потенциальных биомаркеров: цитруллина и кишечинальных белков, призванных выявить повреждение слизистой оболочки кишечника.

Ключевые слова: биомаркеры, цитруллин, I-FABP, I-BABP.

NONINVASIVE BIOMARKERS: CITRULLINE AND INTESTINAL PROTEINS AS A TOOL FOR DIAGNOSIS AND CONTROL OF INTESTINAL MUCOSAL DAMAGE

© Shapovalova N.S.

St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia

Abstract. This article reviews clinical and laboratory studies of potential biomarkers: citrulline and intestinal proteins, designed to detect the intestinal mucosal damage.

Keywords: biomarkers, citrulline, I-FABP, I-BABP.

ВВЕДЕНИЕ

Гистологическое исследование биоптатов слизистой оболочки кишечника является «золотым» стандартом диагностики патологий, сопровождающихся мальабсорбцией у пациентов разного возраста [1–3]. Проводится поиск иммуногистохимических маркеров отдельных заболеваний тонкой кишки [4]. Вместе с тем изучаются неинвазивные методы, призванные стать альтернативой гистологии, в том числе исследование биомаркеров [5–7]. Их использование направлено на улучшение ведения пациентов и контроля заболеваний. Некоторые уже хорошо известны и внедрены в клиническую практику, такие как белки острой фазы воспаления, например, С-реактивный белок и ферретин [8, 9] или фекальный кальпротектин [10] и кальгранулин (S100A12) [11]. Другие же пока тестируются на животных моделях. Клинические и лабораторные исследования потенциальных биомаркеров, призванных выявить повреждение слизистой оболочки кишечника, особенно актуальны в педиатрии.

Цитруллин. Один из наиболее значимых потенциальных биомаркеров для выявления воспаления слизистой оболочки кишечника является цитруллин, определяемый как в сыворотке, так и в плазме крови [12]. Основным источником его продукции — кишечник.

Цитруллин — это аминокислота, продуцируемая преимущественно энтероцитами тонкой кишки. Он синтезируется в энтероците из глутамината и высвобождается в кровоток в виде «маскированной» формы аргинина, чтобы обойти потребление аргинина печенью и превращается обратно в аргинин в почках [12]. В действительности, цитруллин является промежуточным продуктом метаболизма аминокислот [13]. При воспалении слизистой оболочки кишечника масса энтероцитов значительно уменьшается и уровень цитруллина уменьшается тоже, что позволяет считать цитруллин биомаркером массы энтероцитов и, следовательно, абсорбционной способности кишечника. Был проведен ряд исследований для оценки уровня плазменного и сывороточного цитруллина как маркера воспаления слизистой оболочки кишечника. Доклинические исследования показали, что уровень плазменного цитруллина значимо коррелирует с длиной ворсин в метотрексат-индуцированной крысиной модели с воспалением гастроинтестинальной слизистой оболочки [14]. Более того, доклинические исследования выявили, что уровень плазменного цитруллина отражал степень радиационно-индуцированного гастроинтестинального мукозита у крыс и мышей [15, 16]. Также уровень плазменно-

го цитруллина коррелировал со степенью переваривания и абсорбции лактозы и жирных кислот при мукозите у крыс [17]. Одно из первых клинических исследований, касающееся плазменного цитруллина в качестве биомаркера, проведено N.M. Blijlevens с соавторами [18]. Было показано, что низкие уровни цитруллина в сыворотке крови соответствуют тяжелому повреждению слизистой оболочки кишечника у пациентов, получавших трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток [19, 20]. Кроме того, установили, что уровень цитруллина сыворотки уменьшался во время лучевой терапии, коррелируя с выраженностью воспаления слизистой оболочки кишечника [21]. В 2009 году сравнивали определение плазменного цитруллина с несколькими другими методами диагностики воспаления кишечника, например со шкалой оценки мукозита NCI-CTCAE, ежедневной оценкой кишечника (daily gut score), определение плазменного интерлейкина-8, фекального интерлейкина-8, фекального кальпротектина и тестом на поглощение сахара у детей с раком и воспалением гастроинтестинальной слизистой [22]. Авторы показали, что из всех параметров, уровень плазменного цитруллина коррелировал сильнее всего с показателями daily gut score и шкалы NCI-CTCAE [22]. Crenn с соавторами определили, что уровень цитруллина плазмы соотносится с укорочением кишечника и является потенциальным биомаркером массы энтероцитов тонкой кишки при атрофии ворсин у пациентов с целиакией [23]. Кроме того, исследование 500 пациентов с сочетанными заболеваниями кишечника, показало, что цитруллин может быть маркером массы энтероцитов, которая коррелирует с абсорбирующей способностью кишечника. Таким образом, определение цитруллина является неинвазивным способом диагностики мальабсорбции [24].

Alka Singh с соавторами использовали определение уровня цитруллина в сочетании с белками, связывающими жирные кислоты (I-FAB) в плазме и регуляторным геном 1a (Reg1a — маркер регенерации энтероцитов) в сыворотке как способ диагностики атрофии тонкой кишки у больных целиакией. В сравнении с гистологическим исследованием, диагностика атрофии при уровне цитруллина $<40 \mu\text{M/l}$, имела 78% чувствительность, 88% специфичность; при уровне I-FAB $>110 \text{ pg/ml}$, имела 40% чувствительность, 95% специфичность; а при сочетании уровня цитруллина $<30 \mu\text{M/l}$ и I-FAB $>110 \text{ pg/ml}$ — 32% чувстви-

тельность и 100% специфичность. Исследователи показали, что последовательные изменения уровня цитруллина в экспериментах, вместе с изменениями в структуре экспрессии P5CS (поддерживающий маркер цитруллина) предполагают, что плазменный цитруллин является надежным маркером энтеропатии как для диагностики, так и для мониторинга атрофии ворсинок [25]. Наконец, уровень цитруллина, как было показано, не зависит от воспаления или диеты, поскольку питание, по-видимому, является незначимым источником цитруллина [12, 25].

Множество исследований последних лет рекомендует определение уровня цитруллина в сыворотке крови как надежный биомаркер повреждения слизистой оболочки кишечника у онкологических больных, получивших трансплантацию стволовых клеток и/или лучевую терапию [26–29].

Однако, данный биомаркер не может использоваться при почечной недостаточности, если клиренс креатинина ниже 50 мл/мин, так как это увеличивает его уровень [33, 30]. Цитруллин возможно измерить в небольшой объеме, от 30 мкл, методом ионообменной (колончатой) хроматографии [31].

В настоящее время, определение уровня цитруллина в сыворотке крови является хорошим биомаркером воспаления в кишечнике, коррелируя с тяжестью повреждения, атрофией ворсин. Однако для установления точности данного метода требуется значительно больше клинических исследований.

Интестинальные белки, связывающие жирные кислоты (I-FABP), эндогенные цитозольные белки энтероцитов и белки подвздошной кишки, связывающие, желчные кислоты (I-BABP). Эти белки присутствуют в энтероците и образуются в результате его распада, вследствие чего могут выступать в качестве биомаркеров гибели энтероцитов в кишечнике и атрофии его слизистой оболочки. Определение I-FABP как в тканях, так и в плазме крови, показало себя таким маркером в исследовании M.M. Pelsers с соавторами [32]. В 2006 г. D.R. Cronk с соавторами обнаружили связь уровня I-FABP со странгуляционной кишечной непроходимостью, однако участниками исследования стали всего 21 человек [33]. В 2009 г. Derikx и его коллеги показали, что определение цитруллина в комбинации с I-FABP и I-BABP оценивает не только массу энтероцитов, но также их восстановление в тонкой кишке [19].

I-FABP является одним из внутриклеточных белков с низкой молекулярной массой около 15 кДа, который играет важную роль в

транспортировке и метаболизме длинноцепочечных жирных кислот. Белки семейства FABP могут быть использованы как маркеры повреждения ткани на основании следующих характеристик FABP: 1) растворимый белок в цитоплазме, 2) высокая тканевая специфичность, 3) находится в большом количестве в ткани и 4) низкомолекулярный вес. Среди белков семейства FABP связывающий белок жирной кислоты (I-FABP) в большом количестве присутствует в эпителиальных клетках слизистой оболочки тонкой кишки. I-FABP быстро определяется в кровотоке сразу после повреждения слизистой оболочки тонкой кишки. Основываясь на этом механизме, многие исследователи сообщили о связи между концентрацией I-FABP в сыворотке и заболеваниями тонкой кишки еще в начале 1990-х годов. В 2010 г. Н. Funaoka, Т. Kanda и Н. Fujii удалось создать сэндвич-систему ELISA для измерения концентрации I-FABP человека, используя комбинацию антител, очень специфичных к I-FABP. Эта система ELISA не проявляла никакой перекрестной реактивности с другими типами FABP и показала отличные количественные характеристики, такие как воспроизводимость, линейность дилуции и восстановление. Используя эту систему ELISA, определили, что контрольное значение концентрации I-FABP в сыворотке у здоровых людей составляет 2,0 нг/мл или менее. Учитывая клинический потенциал определения концентрации I-FABP в сыворотке крови, эта сэндвич-система ELISA может выступать в качестве инструмента для дифференциальной диагностики острого живота с повреждением слизистой оболочки тонкой кишки [34]. Кроме того, в 2015 г. М. Sarikaya с соавторами в исследовании 74 пациентов показали, что I-FABP является возможным системным маркером болезни Крона (БК). Обнаружено, что уровни I-FABP в сыворотке крови у больных с активным заболеванием были статистически выше, чем у пациентов в группах ремиссии и контроля ($p=0,012$ и $p=0,038$ соответственно). Никаких статистически значимых различий не наблюдалось среди пациентов в группах ремиссии и контроля ($p=0,145$). Корреляционный анализ показал положительную корреляционную зависимость между уровнем I-FABP и наличием БК в активной стадии ($r=0,319$, $p=0,006$). Кроме того, была обнаружена положительная корреляционная зависимость между уровнями С-реактивного белка и I-FABP [35].

Интестинальные белки — прекрасные биомаркеры повреждения энтероцитов. Поскольку повреждение энтероцитов является

главной характеристикой кишечных заболеваний, приводящих к мальабсорбции, в последние годы появилось множество исследований, демонстрирующих роль интестинальных биомаркеров при различных кишечных заболеваниях. Показано, что уровень I-FABP коррелирует со степенью кишечной атрофии по Marsh и уровнем антител IgA anti-TTG (к тканевой трансглутаминазе) [36]. А.С. Vreugdenhil с соавторами при помощи I-FABP определяют активность целиакии у детей [37]. А. G. Thuijls с соавторами используют I-FABP и клаудин-3 для ранней неинвазивной диагностики некротизирующего энтероколита [38]. Уровень I-FABP может использоваться для прогноза развития некротизирующего энтероколита у глубоко недоношенных детей [38]. При этом незначительные изменения слизистой оболочки кишечника не обнаруживают связи с уровнем интестинальных белков. Это продемонстрировало исследование 2016 года, посвященное роли I-FABP в дисфункции кишечного барьера, вызванного нарушением микробиоты у больных с ожирением [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение I-FABP и I-BABP в крови действительно потенциально являются перспективными методами неинвазивной диагностики повреждения кишечной стенки, поскольку эти белки освобождаются из гибнущих зрелых энтероцитов. Однако определение интестинальных белков, вероятно, имеет значение в комбинации с определением цитруллина. Плазменный цитруллин является также одним из наиболее интересных биомаркеров. Несколько исследований показали, что цитруллин возможно измерить в животных моделях, у взрослых пациентов и педиатрических больных. Он легко обнаруживается, последовательно измеряется и способен диагностировать воспаление слизистой оболочки кишечника. Необходимо также заметить, что все клинические исследования проведены на небольших когортах пациентов. Неинвазивные методики диагностики и контроля терапии остаются важным направлением дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельмер С.В., Разумовский А.Ю., Хавкин А.И., Алхасов А.Б., Бехтерева М.К., Волюнец Г.В., Воронин В.А., Воронцова Л.В., Воронцова Л.В., Гасилина Т.В., Голованев М.А., Гончар Н.В., Гуревич А.И., Дронов А.Ф., Ермоленко К.Д., Залихин Д.В., Иванов Д.О., Ионов А.Л., Калинина Е.Ю., Комарова О.Н. и др. Болезни кишечника у детей. Москва, 2018. Том 1

2. Бельмер С.В., Разумовский А.Ю., Хавкин А.И., Алхасов А.Б., Бехтерева М.К., Волинец Г.В., Воронин В.А., Воронцова Л.В., Гасилина Т.В., Голованев М.А., Гончар Н.В., Гуревич А.И., Дронов А.Ф., Ермоленко К.Д., Залихин Д.В., Иванов Д.О., Ионов А.Л., Калинина Е.Ю., Комарова О.Н., Корниенко Е.А. и др. Болезни кишечника у детей. Москва, 2018. Том 2.
3. Kalinina E.Yu., Anichkov N.M. Celiac disease in adults: histological and morphometric data. Архив патологии. 2005. Т. 67. № 2. С. 33–38.
4. Калинина Е.Ю., Аничков Н.М., Крылова Ю., Новикова В.П. Нейроэндокринные диффероны при дуоденитах различной этиологии у детей. Вопросы детской диетологии. 2017. Т. 15. № 2. С. 49–50.
5. Методы исследования органов пищеварения. Гастроэнтерология: руководство для врачей/под ред. Е.И. Ткаченко. — СПб.: ООО «Издательство СпецЛит», 2013. - С.16–83
6. Новикова В.П., Мельникова И.Ю. Методы исследования кишечника у детей и подростков. Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования. Санкт-Петербург, 2006.
7. Белогурова М.Б., Гончар Н.В., Григович И.Н., Думова Н.Б., Корниенко Е.А., Косенко И.М., Луппова Н.Е., Мельникова И.Ю., Новикова В.П., Приворотский В.Ф., Пронина Е.В., Храмцова Е.Г. Детская гастроэнтерология. Практическое руководство / Под редакцией И.Ю. Мельниковой. Москва, 2018. Сер. Библиотека врача-специалиста.
8. Eisenhardt SU, Thiele JR, Bannasch H, Stark GB, Peter K. C-reactive protein: how conformational changes influence inflammatory properties. Cell Cycle. 2009 Dec;8(23):3885–92.
9. Дудина К.Р., Кутателадзе М.М., Знойко О.О. и др. Клиническая значимость маркеров острого воспаления при инфекционной патологии. Казанский медицинский журнал. Актуальные вопросы инфекционной патологии. Т. 95 № 6. 2014. –909–915 с.
10. Лазебник Л.Б., Гусейн-заде М.Г., Ефремов Л.И., Сагынбаева В.Э., Князев О.В. Фекальный кальпротектин как биомаркер эффективности различных медицинских вмешательств у больных воспалительными заболеваниями кишечника. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2013; 8:11–16
11. Kallinich T., Wittkowski H., Keitzer R., Roth J., Foell D. Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever. Ann Rheum Dis. 2010;69(4):677–682. doi:10.1136/ard.2009.114363.
12. Barzal J.A., Szczylik C., Rzepecki P., Jaworska M., Anuszevska E. Plasma citrulline level as a biomarker for cancer therapy-induced small bowel mucosal damage. Acta Biochim. 2014; Pol 61:615–631
13. Crenn P., Coudray-Lucas C., Thuillier F., Cynober L., Messing B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. Gastroenterology. 2000; 119:1496–1505.
14. Fijlstra M., Rings E.H., Verkade H.J., van Dijk T.H., Kamps W.A., Tissing W.J. Lactose maldigestion during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2011;300:283–291.
15. El-Ghazaly M.A., El-Hazek R.M., Khayyal M.T. Protective effect of the herbal preparation, STW 5, against intestinal damage induced by gamma radiation in rats. Int J Radiat Biol. 2015;91:150–156.
16. Lutgens L.C., Deutz N.E., Gueulette J., Cleutjens J.P., Berger M.P., Wouters B.G., von Meyenfeldt M.F., Lambin P. Citrulline: a physiologic marker enabling quantitation and monitoring of epithelial radiation-induced small bowel damage. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003; 57:1067–1074.
17. Fijlstra M., Tissing W.J., Stellaard F., Verkade H.J., Rings E.H. Reduced absorption of long-chain fatty acids during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in the rat. Clin Nutr. 2013;32:452–459.
18. Blijlevens N.M., Lutgens L.C., Schattenberg A.V., Donnelly J.P. Citrulline: a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. Bone Marrow Transplant. 2004; 34:193–196.
19. Derikx J.P., Blijlevens N.M., Donnelly J.P., Fujii H., Kanda T., van Bijnen A.A., Heineman E., Buurman W.A. Loss of enterocyte mass is accompanied by diminished turnover of enterocytes after myeloablative therapy in haematopoietic stem-cell transplant recipients. Ann Oncol. 2009;20:337–342.
20. Lutgens L.C., Deutz N., Granzier-Peters M., Beets-Tan R., DeRuyscher D., Gueulette J., Cleutjens J., Berger M., Wouters B., von Meyenfeldt M., Lambin P. Plasma citrulline concentration: a surrogate end point for radiation-induced mucosal atrophy of the small bowel. A feasibility study in 23 patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;60:275–285.
21. van Vliet M.J., Tissing W.J., Rings E.H., Koetse H.A., Stellaard F., Kamps W.A., de Bont E.S. Citrulline as a marker for chemotherapy-induced mucosal barrier injury in pediatric patients. Pediatr Blood Cancer. 2009;53:1188–1194.
22. Crenn P., Vahedi K., Lavergne-Slove A., Cynober L., Matuchansky C., Messing B. Plasma citrulline: a marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. Gastroenterology. 2003 May;124(5):1210–9.
23. Crenn P., Messing B., Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. Clin Nutr. 2008;27:328–339.
24. Non-invasive biomarkers for assessment of villous abnormalities in patients with coeliac disease and other enteropathies: An alternative to mucosal biopsies Alka Singh, Anil Kumar Verma, Prasenjit Das, Shyam Prakash, Siddhartha Datta Gupta, Lalit Kumar, Vineet Ahuja, Govind K. Makharia. 2017. Gastroenterology, April 2017; 152(5):p S264.
25. Boukhetala N., Leblond J., Claeysens S., Faure M., Le Pessot F., Bole-Feysot C., Hassan A., Mettraux C., Vuichoud J., Lavoine A., Breuille D., Dechelotte P., Coeffier M. Methotrexate induces intestinal mucositis and alters gut protein metabolism independently of reduced food intake. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;296:182–190.
26. Herbers A.H., Feuth T., Donnelly J.P., Blijlevens N.M. Citrulline-based assessment score: first choice for measuring and monitoring intestinal failure after high-dose chemotherapy. Ann Oncol. 2010; 21:1706–171133.
27. van der Velden W.J., Herbers A.H., Bruggemann R.J., Feuth T., Peter Donnelly J., Blijlevens N.M. Citrulline and albumin as biomarkers for gastrointestinal mucositis in recipients of hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant. 2013; 48:977–981 34.
28. Vokurka S., Svoboda T., Rajdl D., Sedlackova T., Racek J., Koza V., Trefil L. Serum citrulline levels as a marker of enterocyte function in patients after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation—a pilot study. Med Sci Monit. 2013; 19:81–85 35.

29. Gosselin K.B., Feldman H.A., Sonis A.L., Bechard L.J., Kellogg M.D., Gura K., Venick R., Gordon C.M., Guinan E.C., Duggan C. Serum citrulline as a biomarker of gastrointestinal function during hematopoietic cell transplantation in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 58:709–714.
30. Ceballos I., Chauveau P., Guerin V., Bardet J., Parvy P., Kamoun P., Jungers P. Early alterations of plasma free amino acids in chronic renal failure. *Clin Chim Acta.* 1990;188:101–108.
31. Demacker P.N., Beijers A.M., van Daal H., Donnelly J.P., Blijlevens N.M., van den Ouweland J.M. Plasma citrulline measurement using UPLC tandem mass-spectrometry to determine small intestinal enterocyte pathology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed.* 2009;Life Sci 877:387–392.
32. Pelsers M.M., Namiot Z., Kisielewski W., Namiot A., Januszkiewicz M., Hermens W.T., Glatz J.F. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility *Clin Biochem* 2003;36:529–535.
33. Cronk D.R., Houseworth T.P., Cuadrado D.G., Herbert G.S., McNutt P.M., Azarow K.S. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) for the detection of strangulated mechanical small bowel obstruction. *Send to Curr Surg.* 2006 Sep-Oct;63(5):322–5.
34. Funaoka H., Kanda T., Fujii H. Intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) as a new biomarker for intestinal diseases. *Send to Rinsho Byori.* 2010 Feb;58(2):162–8.
35. Sarikaya M., Ergul B., Dogan Z., Filik L., Can M., Arslan L. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a promising test for Crohn's disease: a preliminary study. *Clin Lab.* 2015;61(1–2):87–91.
36. Adriaanse M.P.M., Tack G.J., Passos V.L., Damoiseaux J.G.M.C., Schreurs M.W.J., van Wijck K., Riedl R.G., Masclee A.A.M., Buurman W.A., Mulder C.J.J., Vreugdenhil A.C.E. Serum I-FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37:482–90.
37. Vreugdenhil A.C., Wolters V.M., Adriaanse M.P., Van den Neucker A.M., van Bijnen A.A., Houwen R., Buurman W.A. Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scand J Gastroenterol.* 2011;46:1435–41.
38. Thuijls G., Derikx J.P.M., van Wijck K., Zimmermann L.J.I., Degraeuwe P.L., Mulder T.L., Van der Zee DC, Brouwers H.A.A., Verhoeven B.H., van Heurn L.W.E., Kramer B.W., Buurman W.A., Heineman E. Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis. *Ann Surg.* 2010;251:1174–80.
39. Иванов Д.О., Федосеева Т.А., Воронцова Л.В. Некротический энтероколит (эпидемиология, этиология, патогенез и патоморфология). Вопросы детской диетологии. 2017. Т. 15. № 4. С. 28–36.
40. Eva Lau, Cláudia Marques, Diogo Pestana, Mariana Santoalha, Davide Carvalho, Paula Freitas, and Conceição Calhaucorresponding author The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. *Nutr Metab (Lond).* 2016; 13: 31.