

ИНТЕРЛЕЙКИН-6 В КРОВИ И СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ У ДЕТЕЙ – РЕЦИПИЕНТОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ФОНЕ ПРОФИЛАКТИКИ ОРАЛЬНОГО МУКОЗИТА МЕТОДОМ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ ТКАНЕЙ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Оральный мукозит – нерешенная проблема сопроводительной терапии при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Изучение системных и локальных уровней интерлейкина-6 ([Ил-6]) может быть полезным для понимания патогенеза, прогнозирования и оценки эффективности менеджмента мукозита.

Целью исследования было изучение [Ил-6] в крови и слюне детей-реципиентов ГСК в контексте мукозита и его профилактики.

В проспективном контролируемом исследовании у 19 детей – реципиентов алло-ГСК спектрофотометрическим методом определены [Ил-6] в крови, а также у 10 из них в слюне на 7-й день трансплантации. Для анализа данные были сгруппированы с учетом выполнения для десяти детей процедур фотобиомодуляции, а также последующего развития легкого (у четырех детей) и тяжелого мукозита (у восьми детей).

Уровни [Ил-6] варьировали в границах 2,6–655,3 пг/мл в крови и 1,1–634,3 пг/мл в слюне, с тенденцией к повышению накануне клинического начала легкого мукозита и статистически значимом росте накануне тяжелого мукозита (в крови 48,7 [27,2–252,3] пг/мл, в слюне – 618,2 [444,1–634,3] пг/мл). В случаях, протекавших на фоне фотобиомодуляции без мукозита, уровни [Ил-6] в крови (8,6 [2,6–30,8] пг/мл) и слюне (7,5 [1,1–40,4] пг/мл) были минимальными.

Результаты свидетельствуют о значительной роли Ил-6 в патогенезе мукозита при ТГСК и поддерживают версию о высокой цитокиновой активности тканей полости рта, а также дают основание для разработки методов диагностики риска мукозита и оценки эффективности его менеджмента при ТГСК на основе измерения [Ил-6] в крови и, что предпочтительнее, слюне.

***Ключевые слова:** трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, мукозит, интерлейкин-6, фотобиомодуляция, дети.*

T. V. Papruzhenka, S. P. Borys

LEVELS OF INTERLEUKIN-6 IN BLOOD AND SALIVA IN CHILDREN – RECIPIENTS OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS DURING PROPHYLAXIS OF ORAL MUCOSITIS WITH PHOTOBIO-MODULATION METHOD

Oral mucositis (OM) is unresolved problem of accompanying therapy after hematopoietic stem cells transplantation (HSCT). Analysis of systemic and local interleukin-6 (IL-6) levels may be useful for understanding of pathogenesis, prognosis and assessment of oral mucositis management.

The aim of the study was to study interleukin-6 levels in blood and saliva in children-recipients of hematopoietic stem cells in pathogenesis and prevention of oral mucositis.

Nineteen children and adolescents participated in our prospective control study. Spectrophotometric method was used for detection of interleukin-6 levels in blood (19 patients) and in saliva (10 patients)

□ Оригинальные научные публикации

on day 7 after transplantation. The data were analyzed in 10 patients who have received photobiomodulation. Severity of mucositis was assessed in 19 patients, among them mild mucositis developed in 4 patients and severe mucositis – in 8 patients.

Levels of interleukin-6 in the blood ranged from 2,6 to 655,3 pg/ml, in saliva from 1,1 to 634,3 pg/ml. In mild mucositis, levels of interleukin-6 have tendency towards increase at the onset of the clinical symptoms of mucositis. In severe mucositis, levels of interleukin-6 were significantly higher at the onset of the clinical symptoms of mucositis (48,7 [27,2–252,3] pg/ml in the blood and 618,2 [444,1–634,3] pg/ml in saliva). In cases without oral mucositis, in patients receiving photobiomodulation levels of interleukin-6 were minimal and averaged 8,6 [2,6...30,8] pg/ml in the blood and 7,5 [1,1–40,4] pg/ml in saliva.

Our results indicate about significant role of interleukin-6 in pathogenesis of oral mucositis after HSCT and support the version concerning high cytokine activity of the oral tissue. In turn, this can be the basis for the development of different methods of diagnosis of risk factors of oral mucositis and assessment of efficacy of OM management after HSCT using measurement of IL-6 in the blood and preferentially - in the saliva.

Key words: hematopoietic stem cells transplantation, mucositis, interleukin-6, photobiomodulation, children.

Интерлейкин-6 (Ил-6) – противовоспалительный цитокин, который в клинической медицине рассматривают как маркер воспаления, потенциально полезный для понимания патогенеза, прогнозирования и диагностики инфекционного, травматического, аутоиммунного повреждения тканей, а также для оценки эффективности соответствующей терапии [1, 5, 10]. Поскольку продуцентами Ил-6 являются иммунные клетки, а также эндотелиоциты, эпителиоциты, фибробласты и т. д., локализованные альтернативные процессы могут сопровождаться повышением уровня Ил-6 как в крови, так и в биологических субстратах зоны поражения, в том числе в полости рта [2, 5, 7]. В литературе имеются немногочисленные разноречивые оценки ассоциации концентрации Ил-6 в крови, слюне и десневой жидкости при патологии периодонта и слизистой оболочки полости рта (СОПР); обнаружился неудовлетворенный интерес к этой теме исследователей проблемы орального мукозита (ОМ), осложняющего противоопухолевую терапию [4, 8, 10]. Одним из перспективных методов менеджмента ОМ является применение низкоинтенсивного красного лазерного света для фотобиомодуляции (ФБМ) тканей, к разносторонним эффектам которой причисляют как повышающую, так и понижающую модуляцию производства провоспалительных интерлейкинов.

Целью исследования стало изучение уровней Ил-6 в крови и ротовой жидкости детей-реципиентов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в условиях применения метода ФБМ для профилактики ОМ.

Материал и методы. В проспективном продольном контролируемом исследовании, одобренным этическим комитетом РНПЦДетской онкологии, гематологии и иммунологии, с согласия родителей участвовали 19 детей в возрасте от 1,1 до 16,4 лет ($M_e = 4,4$ года), страдающих от онкогематологических заболеваний (девять детей) и других нарушений кроветворения на этапе подготовки к транспланта-

ции алло-ГСК. Протоколы кондиционирования, принятые в РНПЦ, включали комбинации цитостатических препаратов (треосульфат, циклофосфан, флударабин, мелфалан, бусульфат, этопозид-VP 16, эндоксан) и тотальное облучение тела, а также назначения для профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (метотрексат, циклоспорин и антимоноцитарный иммуноглобулин) и контроля инфекционных осложнений.

Десять детей наряду со стандартной поддержкой получали процедуры ФБМ с использованием лазерного полупроводникового аппарата «Снаг-Сенс-К» с длиной волны $670 \pm 0,02$ нм площадью светового пятна $0,5 \text{ см}^2$ при мощности 30 мВт в непрерывном режиме; курс ФБМ начинали накануне кондиционирования и, через день, выполняли не менее пяти процедур, во время которых последовательно сканировали каждую из подверженных ОМ 13 зон СОПР при прямом или транскутантном доступе в течение 12 или 24 сек соответственно с общей плотностью дозы энергии одной процедуры ФБМ $5,16 \text{ Дж/см}^2$.

Признаки ОМ регистрировали в соответствии с критериями индекса оральной токсичности iWHO, где код 0 означает нормальное состояние, коды 1 и 2 – легкое течение ОМ (1 – отек, эритема, 2 – СОПР изъязвлена, но пациент может принимать твердую пищу), коды 3 и 4 – тяжелый ОМ (3 – пациент принимает только жидкую пищу; 4 – прием пищи и лекарств через рот невозможен). Мукозит был отмечен у 12 детей: в группе сравнения пострадали все дети (шестеро – тяжело), на фоне ФБМ ОМ развился у трех детей (два случая были тяжелыми); клинические признаки ОМ в группе сравнения появились спустя M (95% ДИ) = 8,7 (6,9–10,5) дней от начала кондиционирования, в группе с ФБМ – спустя 11,1 (8,8–13,5) дней.

Концентрацию Ил-6 во взятых на +7-й день от начала трансплантации образцах крови (у всех 19 детей) и ротовой жидкости (у 10 детей, получавших процедуры ФБМ), определяли при помощи спект-

рофотометра Sunrise (Tecan, Австрия) и набора реагентов ИФА-БЕСТ (Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

Результаты измерений уровня Ил-6 представлены медианой и размахом. В обработке результатов использовали методы непараметрической статистики: критерий Манна –Уитни для оценки различий двух групп, критерий Краскела-Уоллиса для трех групп с последующим попарным сравнением групп по критерию Данна, а также графический анализ данных; критический уровень значимости различий в исследовании принят $p = 0,05$.

Результаты и обсуждение. Уровни Ил-6 в крови варьировали от 2,6 пг/мл до 655,3 пг/мл без значимых различий между показателями детей, получавших и не получавших метотрексат: Me [min–max] = 15,9[2,6–655,3] пг/мл и 20,9[6,8–252,3] пг/мл соответственно ($p = 0,902$).

Уровни ИЛ-6 в ротовой жидкости имели значения от 1,1 до 634,3 пг/мл, в т. ч. 28,9[1,2–634,3] пг/мл на фоне назначения метотрексата и 6,4[8,3–612,2] пг/мл без него ($p > 0,99$).

Анализ изучаемых показателей с учетом состояния СОПР детей, приведенных на рисунках 1 и 2, дал следующие результаты. В крови детей, СОПР которых в дальнейшем не изменилась (ОМ₀), уровни Ил-6 составили 8,6 [2,6–30,8] пг/мл, тогда как у детей, состояние которых в дальнейшем осложнилось ОМ₁₋₄, – 33,75 [8,83–655,3] пг/мл ($p = 0,013$); соответствующие показатели в слюне составили ряды 7,45 [1,12–40,4] пг/мл и 618,2 [444,3–634,3] пг/мл ($p = 0,017$). Разделение случаев ОМ на легкие и тяжелые позволило составить соответствующие ряды концентраций Ил-6 в крови (11,6 [8,8–655,3] пг/мл и 48,7 [27,2–252,3] пг/мл) и оценить различия между показателями подгрупп ОМ₀, ОМ_{1,2} и ОМ_{2,3}: $p_{0\text{ vs }1,2} > 0,05$; $p_{0;1,2\text{ vs }3,4} < 0,01$. Графический анализ уровней Ил-6 в крови на +7-й день трансплантации у детей с учетом сроков клинического начала ОМ обнаружил слабый тренд к увеличению изучаемых показателей по мере приближения манифестации ОМ ($y = 14,361x + 139,63$; $R_2 = 0,05$).

Сопоставление уровней Ил-6 в крови детей из группы сравнения (20,9 [8,83–655,3] пг/мл) с данными детей, получавших процедуры ФБМ (17,0 [2,6–136,8] пг/мл), не обнаружило между ними различий ($p = 0,400$). Когда детей, получавших ФБМ, разделили на подгруппы с учетом состояния СОПР (у детей без перспективы ОМ концентрация Ил-6 составила 8,6 [2,6–30,8] пг/мл, у детей с ОМ – 60,9 [48,7–136,8] пг/мл) и провели статистический анализ этих двух наборов данных и данных группы сравнения, наличие различий между ними подтвердилось ($p = 0,022$), однако, как видно на рисунке 2, при попарном сопоставлении статистически значимыми оказались только различия между подгруппами детей, получавших ФБМ.

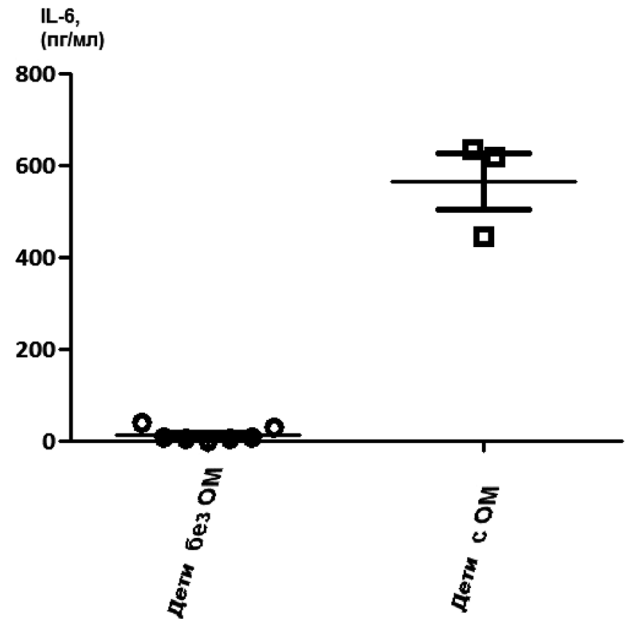


Рис. 1. Содержание ИЛ-6 в ротовой жидкости детей-реципиентов ГСК на седьмые сутки от начала проведения режима кондиционирования

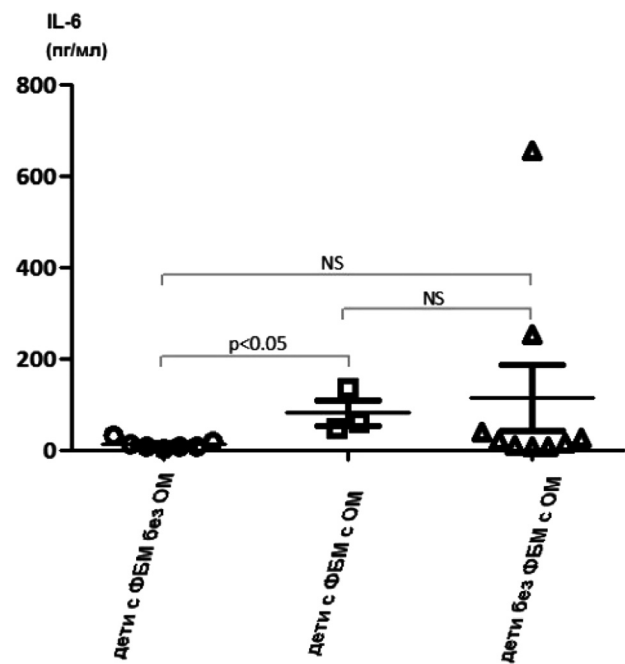


Рис. 2. Содержание ИЛ-6 в крови детей-реципиентов ГСК на седьмые сутки от начала проведения режима кондиционирования

В слюне детей без перспективы клинического ОМ концентрации Ил-6 определены как 7,5 [1,1–40,4] пг/мл; у детей, пострадавших в дальнейшем от ОМ с его клиническим началом на +9-й, +10-й и +14-й дни, – 618,2 [444,1–634,3] пг/мл ($p = 0,017$).

Сравнение уровней Ил-6 в крови и в слюне детей статистически значимых различий не обнаружило (17,0 [2,6–136,8] пг/мл и 18,4 [1,1–634,3] пг/мл соответственно, $p = 0,557$), при этом у четырех детей (без ОМ) концентрации Ил-6 в крови и слюне

□ Оригинальные научные публикации

были близкими, у двух детей (без ОМ) уровни Ил-6 в крови в 5–15 раз превышали таковые в слюне, а у детей, которые впоследствии перенесли клинический ОМ, явно доминировали уровни Ил-6 в слюне – 618,2 [444,1–634,3] пг/мл против 60,9 [48,7–136,8] пг/мл в крови, $p < 0,01$).

Как следует из анализа публикаций, у здоровых людей Ил-6 вырабатывается в минимальном количестве: у взрослых в крови находят от $0,37 \pm 0,22$ до $4,3 \pm 1,1$ пг/мл [2, 3], в слюне – $4,1 \pm 1,1$ пг/мл [2], у детей – $0,05 \pm 0,03$ и $0,81 \pm 0,45$ пг/мл соответственно [3]. Уровни Ил-6 в биосредах у детей-реципиентов ГСК во всех изученных нами случаях превышает нормальный (медианные значения отличаются в десятки, а максимальные – в сотни раз), что принципиально не противоречит наблюдениям, сделанным в практике ТГСК у взрослых [4, 8].

Ввиду противоречивости мнений о влиянии метотрексата на выработку Ил-6 при противоопухолевой терапии мы учли факт введения этого цитостатика некоторым детям, однако не нашли доказательств влияния данного назначения (10 мг/м^2 в дни +1, +3, +6 внутривенно) на исследуемые параметры.

Повышение уровня Ил-6 в крови при ТГСК у взрослых, обнаруженное в немногочисленных опубликованных работах, относят на счет аплазии костного мозга и активизации оппортунистических инфекционных агентов [8], печеночной и легочной дисфункции [4], но не находят связи с ОМ [4]. Биоматериалы, изученные нами, были получены у детей на +7-й день от начала трансплантации (в стандартные для ТГСК сроки мониторинга состояния пациентов), что для большинства случаев ОМ было кануном появления его первых клинических признаков. В отсутствие ОМ (что имело место только на фоне ФБМ-профилактики) показатели концентрации Ил-6 в крови уложились в диапазон от 3 до 40 пг/мл, у детей с легким течением ОМ во всех случаях, кроме одного с максимальным показателем, – от 10 до 60 пг/мл, при тяжелом ОМ – от 30 до 250 пг/мл. Наличие «выскакивающих» высоких показателей уровня Ил-6, которые могли иметь не связанные с ОМ причины, маскирует интересующие нас тенденции, однако даже в такой сложной картине, составленной из небольшого числа наблюдений, подтверждены статистически значимые различия между уровнями Ил-6 в крови детей без перспективы ОМ и детей, находящихся в предклинической фазе развития ОМ.

Уровень Ил-6 в оральной среде интересует исследователей различных патологических, в том числе системных, процессов, однако ожидаемая связь между альтерацией/воспалением тканей полости рта и концентрацией этого цитокина в оральных средах определяется только в части наблюдений: так, сообщают о росте содержания Ил-6 в слюне при генерализованном периодонтите [2], красном

плоском лишае СОПР [5], но не находят его при гингивите [6] и афтозном стоматите [7]. В единственном доступном исследовании такого рода, проведенном в группе взрослых пациентов с ТГСК, связи между ОМ и уровнем Ил-6 в десневой жидкости не нашли [10]. В наших немногочисленных наблюдениях обнаружено весьма существенное (и поэтому статистически значимое) повышение Ил-6 в слюне детей за 2–7 дней до появления клинических признаков ОМ, что можно рассматривать как подтверждение гипотезы патогенеза ОМ, в которой важная роль отведена провоспалительным цитокинам [10].

Одним из аспектов изучения механизмов воспаления в полости рта является вопрос о соотношении уровней Ил-6 в крови и слюне. Известны разноречивые суждения: так, сообщают о том, что у здоровых лиц уровни Ил-6 в этих средах имеют значения одного порядка [2, 3], но при высокой физической нагрузке рост показателя в крови не сопровождается изменениями в слюне [9], при этом маркером риска осложнений острой коронарной недостаточности считают увеличение концентрации Ил-6 в слюне, но не в крови [1]. У пациентов с красным плоским лишаем СОПР [5], как и у взрослых реципиентов ГСК с опытом ОМ и без такового наблюдают параллельное повышение Ил-6 в крови и в слюне [10]. У детей, участвовавших в нашем исследовании, наблюдались все варианты соотношений обсуждаемых показателей: в ситуациях, не отягощенных ОМ, регистрировали близкие показатели или преобладание сывороточного, но накануне ОМ уровни слюнного ИЛ-6 многократно превышали таковые крови. Эти результаты можно трактовать в пользу активного участия эпителиоцитов (с оговоркой о полной неизвестности относительно роли тканей слюнных желез) в патогенезе воспаления СОПР и, в том числе, ОМ.

Большинство исследований Ил-6 в биосубстратах тестируют возможность его использования для прогнозирования патологии и оценки ее тяжести [1–3, 5, 6]. По результатам нашей работы можно рекомендовать определение Ил-6 в крови и, что лучше, в слюне для прогнозирования тяжелого ОМ у детей-реципиентов ГСК в период кондиционирования по описанным выше протоколам; выявленные тенденции указывают на возможность распространения предложения и на легкие случаи ОМ, что, однако, как и выбор оптимальных сроков забора материала, требует дополнительных исследований.

Еще одно потенциальное практическое применение сведений об уровне ИЛ-6 в биосубстратах – оценка эффективности контроля воспалительных процессов [1–3, 6]. По многим отзывам, ФМБ имеет противовоспалительные эффекты, в том числе поддерживает энергию клеток, необходимую для процессов репликации, что может иметь особое значение для ОМ, вызванного цитостатическим воздей-

ствии на ткани. Мы не получили прямых статистических доказательств снижения Ил-6 в крови у всех детей, получавших процедуры ФМБ, но можем говорить об относительно низких уровнях Ил-6 у детей, получавших ФМБ и (благодаря этому) избежавших ОМ.

Таким образом, впервые получены сведения о том, что дети-реципиенты алло-ГСК на этапе кондиционирования имеют повышенные концентрации Ил-6 в крови и слюне. Максимальные уровни в этих биосубстратах, полученных на +7-й день, определяются у детей с перспективой тяжелого ОМ, при этом уровни Ил-6 в слюне многократно превышают таковые в крови. На фоне профилактических процедур ФМБ риск ОМ снижается, так что часть детей избегает ОМ, и показатели концентрации Ил-6 в их крови и в слюне меньше других отличаются от нормальных. Результаты исследования свидетельствуют о значительной роли Ил-6 в патогенезе ОМ при ТГСК и поддерживают версию о высокой цитокиновой активности СОПР, а также дают основание для разработки методов диагностики риска ОМ и оценки эффективности менеджмента ОМ при ТГСК на основе измерения уровня Ил-6 в крови и, что еще предпочтительнее, в слюне.

Литература

1. *Возможность прогнозирования течения госпитального периода острого коронарного синдрома с помощью маркеров иммунного воспаления* / М. А. Шаленкова [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2014. – № 4. – С. 41–46.
2. *Перова, Н. Ю.* Изучение иммуотропного эффекта препарата ликопид в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / Н. Ю. Перова, Е. Л. Вини-

Оригинальные научные публикации

ченко, Н. А. Бондаренко // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 3. – С. 639–642. – Режим доступа: http://www.Rae.Ru/upfs/?section = content&op = show_article&article_id = 6685.

3. *Система про- и противовоспалительных цитокинов при хронических гастродуоденитах у детей* / Э. В. Дудникова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 1. – Режим доступа: <http://cyberleninka.Ru/article>. – Дата доступа: 25.12.2015.

4. *IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation* / C. Ferrà [et al.] // *Haematologica*. – 1998. – Vol. 83, № 12. – P. 1082–1087.

5. *Interleukin-6 and neopterin levels in the serum and saliva of patients with Lichen planus and oral Lichen planus* / A. Abdel-Haq [et al.] // *J. Oral Pathol. Med.* – 2014. – Vol. 43, № 10. – P. 734–739.

6. *Salivary and crevicular fluid interleukins in gingivitis* / M. Boronat-Catalá [et al.] // *J. Clin. Exp. Dent.* – 2014. – Vol. 6, № 2. – P. e175–179.

7. *Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous ulceration* / V. V. Boras [et al.] // *J. Oral Pathol. Med.* – 2006. – Vol. 35, № 4. – P. 241–243.

8. *Serum interleukin-6 levels during bone marrow transplantation: impact on transplant-related toxicity and engraftment* / M. Steffen [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 1996. – Vol. 18, № 2. – P. 301–307.

9. *The relationship between interleukin-6 in saliva, venous and capillary plasma, at rest and in response to exercise* / T. Cullen [et al.] // *Cytokine*. – 2015. – Vol. 71, № 2. – P. 397–400.

10. *The relationship between oral mucositis and levels of pro-inflammatory cytokines in serum and in gingival crevicular fluid in allogeneic stem cell recipients* / K. G. Legert [et al.] // *Support. Care Cancer*. – 2015. – Vol. 23, № 6. – P. 1749–1757.

Поступила 4.03.2016 г.