

РІВНІ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ГЕМОДІАЛІЗНИХ ПАЦІЄНТІВ З СИНДРОМОМ НЕСПОКІЙНИХ НІГ

©І. О. Дудар, В. Є. Дряньська, О. В. Буштинська*

ДУ «Інститут нефрології АМН України», м. Київ

КЗ ТОР «Тернопільська університетська лікарня», м. Тернопіль, Україна*

РЕЗЮМЕ. В дослідженні вивчалися рівні прозапальних цитокінів, а саме ІЛ-1, ІЛ-7, ІЛ-18, ФНП- α у пацієнтів із ХХН, які перебувають на програмному гемодіалізі із та без синдрому неспокійних ніг (СНН). Діагностика СНН проводилася згідно із критеріями, розробленими міжнародною групою RLS-IRLSSG (International Restless Legs Syndrome Study Group). Встановлено, що рівень ФНП- α у хворих з СНН достовірно вищий, ніж у пацієнтів без цього синдрому. Рівні ІЛ-1, ІЛ-17, ІЛ-18 у обох групах достовірно не відрізнялися.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: синдром неспокійних ніг, програмний гемодіаліз, прозапальні цитокіни.

Протягом останніх років інтерес вчених прикутий до вивчення низькомолекулярних пептидів – цитокінів та їх ролі в патогенезі різних захворювань, в тому числі і захворювань нирок. Вже сьогодні є поодинокі публікації про їх роль у розвитку лихоманки, розладів сну, інтрадіалізної гіпотензії, сверблячки шкіри, раннього атеросклерозу та розвиток кардіоваскулярних ускладнень та врешті – на виживання діалітичних пацієнтів [1].

Аналізи результатів досліджень циркулюючих TNF- α , ІЛ-1, ІЛ-6 в крові пацієнтів перед діалізом та діалітичних хворих не виявили суттєвих відмінностей в концентрації цих цитокінів, що дозволило висловити припущення про те, що уремічний синдром є важливою причиною підвищення продукції цитокінів [2]. Сучасні дані свідчать про наявність тісних зв'язків між концентрацією цитокінів та функцією нирок: зниження функції нирок супроводжується значним підвищенням концентрації цитокінів у сироватці крові [3].

У пацієнтів, які одержують замісну ниркову терапію (ЗНТ) виявлено високу концентрацію розчинних рецепторів цитокінів (ІЛ-1а, TNFsR) [4]. Проте аналізуючи експериментальні та клінічні дані було висунуто гіпотезу, що їх концентрація у діалітичних пацієнтів недостатня для блокування системних ефектів цитокінів [4]. Високі рівні розчинних рецепторів розглядаються, як маркери запалення у хворих, що одержують ЗНТ [4].

Існує кореляція між синдромом неспокійних ніг та збільшенням рівня прозапальних цитокінів і підвищеним рівнем СРБ. Чим вищий СРБ, тим менший час сну [5]. Рівень СРБ регулюється ІЛ-6, експресія якого стимулює TNF- α і ІЛ-1 [6].

Прозапальні ІЛ-1 та ФНП- α переважно продукуються моноцитами/макрофагами. За своїми біологічними функціями ФНП- α нагадує ІЛ-1 та ІЛ-6 та впливає на ендотелій судин, підсилюючи експресію на ньому молекул адгезії, активує макрофаги, нейтрофіли, підсилює секрецію простагландинів, має хемотаксичну дію на різні клітини, зумовлює

синтез білків гострої фази запалення, тобто він регулює цитокіновий каскад та є причиною запалення і місцевої деструктивної реакції. Беручи до уваги роль TNF- α в розвитку серцевої недостатності у діалітичних хворих, він є несприятливим фактором, що значно впливає на тривалість та якість їх життя [7, 8]. Значне підвищення ІЛ-1 сприяє синтезу в печінці гострофазових білків (СРБ, церулоплазміну, фібриногену) і регулює тканинний обмін шляхом протеолізу скелетних м'язів. Всі ці фактори призводять до зниження рівня гемоглобіну, сироваткового преальбуміну, трансферину та зменшують синтез білка в печінці. Продукція прозапальних цитокінів призводить також до більш високого еритропоетинного індексу спротиву [9], що поглиблює появи анемії, а вона, в свою чергу, є одним з факторів розвитку RLS.

ІЛ-18 самостійно (FasL) або через γ -ІФ (Fas) стимулює ініціацію процесів апоптозу, що привертає до нього ще більшу нашу увагу. Високі показники ІЛ-18 знаходять у вогнищах хронічного запалення, при автоімунних захворюваннях та в онкоутвореннях [3]; вважають, що цей цитокін бере участь в стимуляції запалення та розвитку атеросклерозу [10], хоча інші автори не виявили статистично значущого зв'язку між концентрацією ІЛ-18, субклінічними та клінічними проявами атеросклерозу [11].

Етіологічна та патогенетична роль ІЛ-17 досліджується при багатьох інфекційних та автоімунних захворюваннях [12]; показано, що його рівні збільшуються при деяких запальних станах, таких як системний склероз, псоріаз і ревматоїдний артрит, коліт, енцефаломієліт, розсіяний склероз [13].

Синдром неспокійних ніг (СНН) у гемодіалітичних пацієнтів розглядається як прояв полінейропатії, що тісно пов'язана з процесами запалення. Тому ми вважаємо за доцільне вивчити особливості прозапальних цитокінів у хворих з СНН, які лікуються програмним гемодіалізом, та методи їх корекції.

Мета роботи: вивчення рівнів прозапальних цитокінів у пацієнтів з ХХН та синдромом неспокійних ніг.

Матеріал та методи дослідження. До дослідження було залучено 40 хворих з ХХН VД ст., яких лікували програмним гемодіалізом на базі Тернопільської університетської клініки у відділенні гемодіалізу протягом 2009–2010 років. Критеріями включення в дослідження були: вік більше 18 років, лікування ГД понад 3 місяці, наявність чи відсутність СНН, письмова згода на участь у дослідженні.

Критеріями виключення вважались: наявність гострих чи загострення хронічних захворювань печінки (вірусні гепатити, підвищення рівнів ферментів печінки (АЛТ, АСТ) більш, ніж у 3 рази); наявність онкологічних захворювань; встановлений діагноз ішемічної хвороби серця, наявність ЦД 2 типу, гострого порушення мозкового кровообігу, тромбоз судин, вагітність або лактація, відмова пацієнта. Виключались також пацієнти з аритміями, які потребують корекції антиаритмічними засобами (шлуночкові екстрасистолії, миготіння та тріпотіння передсердь, пароксизмальні тахікардії, синдром брадисистолії); пацієнти, які отримують циклоспорин, такролімус, антибіотики макролідного ряду, фібрати, ніотинову кислоту. Виключались також вагітність або лактація; відмова пацієнта.

Крім того пацієнти обов'язково дали усну та письмову згоду на участь у дослідженні.

Всім хворим ГД проводився за стандартною програмою (3 рази на тиждень по 4–4,5 год.) на діалітичних апаратах фірми Gambro (AK-95 та INOVA) з використанням бікарбонатного діалізуючого розчину. Процедура здійснювалась на індивідуально підібраних діалізаторах фірми Gambro (14L, 17L). Швидкість кровотоку складала 250–300 мл/хв. Одержана доза діалізу – діалітичний індекс $KT/V \geq 1,2$.

Залежно від наявності проявів СНН хворі з ХХН V ст. були поділені на дві групи. Першу групу склали пацієнти без СНН – 20 осіб, другу групу – пацієнти з проявами СНН – 20 осіб. У всіх пацієнтів був проведений забір сироватки крові для прове-

дення загальноклінічних та імунологічних досліджень.

Визначалися прозапальні цитокіни – ІЛ-1, ФНП- α , ІЛ-17 та ІЛ-18. Рівні цитокінів визначалися в сироватках крові за допомогою імуноферментного методу на аналізаторі STAT-Fax Plus-303 (USA); використовували тест-системи "DIACLON" (Франція), DRG (Німеччина).

До 96-лункових планшет додавали: по 100 мкл стандартів у відповідні лунки для побудови калібрувальної кривої. В інші лунки вносили по 100 мкл сироватки, що досліджувалася. В усі лунки додавали по 50 мкл відповідних антицитокінових антитіл. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин, потім лунки 5 разів ретельно промивали буфером і видаляли залишки рідини.

Далі в кожну лунку вносили по 100 мкл кон'югату (стрептовідин-пероксидазу), включаючи «нульову» пробу. Після цього проби інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Повторювали промивку планшети 5 разів та вносили до всіх лунок по 100 мкл ТМВ-субстрату (хромогену) агента, що утворює кольори. Після інкубації протягом 12–15 хвилин зупиняли ферментативно-субстратну реакцію, додаючи в кожну лунку по 100 мкл H_2SO_4 . Далі проводили визначення оптичної щільності стандартів та зразків супернатантів при довжині хвилі 450 нанометрів.

Для достовірної оцінки результатів калібрування стандартна крива при побудові повинна бути лінійною і вказувати на прямо пропорційний характер між рівнем концентрації цитокіну в сироватці та оптичною щільністю. Дані аналізу проб щодо рівня синтезу цитокінів визначали шляхом їх інтерполяції з отриманою кривою.

Також оцінювались антропометричні та загальноклінічні дані.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програмного пакету Statistica 6,0. Значення досліджуваних показників представлені як $p < 0,05$.

Результати й обговорення. Загальна характеристика пацієнтів обох груп подана в таблиці 1.

Таблиця 1. Показники пацієнтів без та з СНН

1	Пацієнти без СНН	Пацієнти з СНН
2	3	
Кількість пацієнтів (n)	20	20
Вік (роки)	47,88±3,25	51,13±2,56
Зріст (см)	174,19±3,37	166,44±1,91
Вага (кг)	74,29±4,38	73,15±4,52
ІМТ (кг/м ²)	24,32±1,08	26,57±1,77
Тривалість лікування ГД (місяці)	49,00±9,45	43,44±8,06
Годин ГД на тиждень	10,99±0,42	11,24±0,35
Сечовина сироватки перед ГД (ммоль/л)	28,19±0,56	28,22±0,58
Ультрафільтрація за ГД (л)	2,61±0,30	2,67±0,28
Kt/V	1,03±0,02	1,01±0,01

1	2	3
САТ вечір (мм рт. ст.)	137,94±7,28	153,75±5,67
Об'єм діурезу (л)	221,25±84,05	350,00±92,12
Гемоглобін (г/л)	100,69±1,72	100,88±1,48
Феритин (мкг/л)	261,88±4,06	261,75±3,61
Коефіцієнт насичення трансферину залізом (%)	28,44±0,85	28,38±0,83

Наведені в таблиці дані свідчать, що групи пацієнтів не відрізнялись за гендерним складом. Також при подальшому аналізі не виявлено достовірних відмінностей за антропометричними показниками, а саме за зростом, вагою та ІМТ. За загальноклінічними даними – рівні гемоглобіну, феритину, коефіцієнт насичення трансферину у групах майже однакові. При аналізі тривалості лікування гемодіалізом, кількості годин ГД на тиждень, рівнем

УФ та індексом Kt/V достовірних відмінностей між пацієнтами без СНН та з СНН не виявлено. Отже можна констатувати, що групи пацієнтів на початку обстеження є майже однорідними.

Під час аналізу імунологічних показників було виявлено, достовірну відмінність між групою хворих без СНН та пацієнтів із СНН за показниками ФНП- α , а саме (55,82±6,82) проти (86,88±6,88), $p < 0,005$ (таблиця 2).

Таблиця 2

Прозапальні цитокіни	Пацієнти без СНН, (n=20)	Пацієнти з СНН (n=20)
IL-1	99,02±17,32	131,44±9,00
ФНП- α	55,82±6,82	86,88±6,88*
IL-17	607,13±107,95	402,94±79,90
IL-18	71,38±15,05	269,99±87,03

Примітка: * – $p < 0,01$.

Достовірної різниці між групами за показниками IL-1, IL-17, IL-18 не виявлено. Однак ми також спостерігаємо деяке підвищення рівнів IL-1 та IL-18, а також зниження рівня IL-17 у хворих з СНН в порівнянні з хворими, у яких цей синдром відсутній. Підвищення рівня IL-18 у хворих з СНН вказує на можливу його стимуляцію рівнів таких цитокінів, як ФНП- α та IL-1, та підтримання постійного хронічного запалення.

Висновки:

- Пацієнти з СНН мають підвищені рівні IL-1, IL-18 а також знижений рівень IL-17;
- Рівень ФНП- α достовірно вищий у пацієнтів з СНН, порівняно з пацієнтами без проявів СНН.

Перспективи подальших досліджень.

Доцільно вивчити у динаміці особливості зміни показників прозапальних цитокінів у хворих з хронічними захворюваннями нирок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дудар І. О. Хронічне запалення при хронічній хворобі нирок, гіпотези та відповіді / І. О. Дудар // Укр. журнал нефрології та діалізу. – 2007. – № 1 (13). – С. 33–42.
2. Plasma levels of IL-1 β , TNF- β and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure / [Pereira B.J.G., Shapiro L., King A.J et al.] // *Kidney Int.* – 1994. – Vol. 45. – P. 890–896.
3. Interleukin-8 in chronic renal failure and dialysis patient / I. Nakanishi, F. Moutbarrik, N. Okada N [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 1994. – Vol.9. – P. 1435–1442.
4. Pereira J.G. Balance between pro-inflammatory cytokines and their specific inhibitors in patients on dialysis / J. G. Pereira // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 1995. – Supp. 7. – P. 27–32.
5. XL VII European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA – EDTA) Congress: Abstract Sa 592: Jun 26. 2010.
6. Wanner C. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients / C. Wanner, J. Zimmermann, S. Schwedler // *Kidney International.* – 2002. – Vol. 61, Suppl.80. – P. 99–102.
7. Enhanced production of nitric oxide by blood-dialysis membrane interaction / A. Amore, R. Bonaudo, D. Chigo, M. Arese [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 1995. – Vol.6. – P. 1278–1283.
8. Systemically measured cytokines are independently predictive for increased mortality in patients with chronic heart failure / M. Rauchhaus, W. Dohner, V. Koloczek [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2000. – 35. Suppl. A. – P.1183.
9. Perez-Flores I. Relationship between residual renal function, inflammation, and anemia in peritoneal dialysis / I. Perez-Flores, F. Coronel, S. Cigarran // *Adv Perit Dial.* – 2007. – Vol.23. – P.140–3.
10. Хрипко О. П. Аллельный полиморфизм гена интерлейкина-18 и использование дендритных клеток

и интерлейкина-18 для модуляции иммунного ответа при хроническом вирусном гепатите в *in vitro*: автореф. дис. на соискание научной степени канд. биол. наук: спец. 14.00.36. «Иммунология и аллергология» / О. П. Хрипко. – Новосибирск, 2008. – 20 с.

11. Интерлейкин-18 при системной красной волчанке: связь с клиническими проявлениями заболевания и атеросклеротическим поражением сосудов / Т. А. Пана-

фидина, Т. В. Попкова, З. С. Алекберова [и др.] // Терапевтический архив. – 2008. – № 5. – С. 15–20.

12. Bell E. Immune regulation: New player in the generation of T 17 cells / E. Bell // Nature Reviews Immunology. – 2007. – № 7. – P. 581. - doi:10.1038/nri 2139.

13. Cooke A. Th17 Cells in Inflammatory Conditions / A. Cooke // Rev. Diabet. Stud. – 2006. – Vol. 3. – P. 72–75.

THE LEVELS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN HAEMODIALYSIS PATIENTS WITH THE RESTLESS LEGS SYNDROME

©I. O. Dudar, V. Ye. Driyanska, O. V. Bushtynska*

SI «Institute of Nephrology of AMS of Ukraine», Kyiv

*ME TRC «Ternopil University Hospital», Ternopil, Ukraine**

SUMMARY. The levels of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-17, IL-18, TNF- α) in patients with or without RLS were studied in investigation. Diagnostics of RLS according to the criteria of international group RLS – IRLSSG (International Restless Legs Syndrome Study Group). It was set that patients with RLS have a level of FNF- α for certain higher, than for patients in which this syndrome is absent. Our data detected higher level of TNF- α in patients with RLS. The datas of IL-1, IL-17, IL-18 did not differ for certain.

KEY WORDS: restless, legs syndrome, programme hemodialysis, inflammatory cytokines.