

# Влияние тигециклина на цитокинопродукцию клеток периферической крови пациентов с хроническим пиелонефритом на фоне ХПН

**Effect of tigecycline on the production of the cytokines in peripheral blood cells in chronic pyelonephritis patients with CRF**

*E.N. Kareva, S.K. Jarovoiy, N.G. Moskaleva, N.S. Aleksandrov, D.A. Tihonov*

In this article we present the results of the study, aimed to estimate the influence of the glycylicycline antibiotic tigecycline on the production of cytokines by mononuclear cells of the peripheral blood in 43 patients: 21 patients with chronic obstructive pyelonephritis and chronic kidney disease, both as a consequence of urolithiasis (main group), and 22 healthy men with normal kidney function without any other diseases (control group).

As the criteria of the cytokine production tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and Interleukin-8 (IL-8) were chosen, being correspondingly the cytokines of pro- and counter-inflammatory action.

The stimulatory influence of tigecycline was shown for TNF-alpha in patients with chronic kidney disease due to urolithiasis, while this effect was not present in patients with normal kidney function. The influence of tigecycline on IL-8 was not shown for both groups.

During the analysis of the obtained data the suggestion was made, that stimulatory effects of tigecycline on TNF-alpha production by mononuclear cells of the peripheral blood could have positive clinical effects in patients with chronic kidney disease and chronic pyelonephritis due to urolithiasis, given that the pro-inflammatory cytokines are initially lack in these patients.

*Е.Н. Карева<sup>1</sup>, С.К. Яровой<sup>2</sup>, Н.Г. Москалева<sup>2</sup>, Н.С. Александров<sup>2</sup>, Д.А. Тихонов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России – кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика РАМН П.В.Сергеева

<sup>2</sup> ФГБУ «НИИ урологии» Минздрава России

**В** настоящее время наблюдается значительный рост числа возбудителей, обладающих устойчивостью к противомикробным средствам. Выпускаемые на рынок новые лекарственные средства в большинстве случаев относятся к уже известным фармакологическим группам, то есть представляют собой более или менее усовершенствованные аналоги существующих антибактериальных препаратов [1, 2]. Госпитальная флора в ряде случаев оказывается способной сравнительно быстро сформировать системы защиты в отношении этих антибиотиков [3]. Поэтому особый интерес представляют антибактериальные препараты новых фармакологических групп.

В 2010 году в России появился новый антибактериальный препарат Тигециклин (одобренный U.S. Food and Drug Administration (FDA) в июне 2005) [4], относящийся к новому классу антибиотиков – глицилциклинов. Глицилциклины – полусинтетические антимикробные препараты, имеющие структурное сходство с антибиотиками тетрацик-

линового ряда. Они обладают широким спектром антимикробной активности в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных возбудителей [5, 6]. Глицилциклины способны подавлять отдельные штаммы тетрациклин-резистентных бактерий посредством ингибирования синтеза белков Tet (M) и Tet (O) [7, 8]. При этом процесс ингибирования синтеза белков бактериальной клетки происходит в 20 раз эффективнее по сравнению с тетрациклином [9].

Тигециклин (ТГ), являющийся единственным зарегистрированным в России представителем глицилциклинов, активен в отношении грамположительных аэробных кокков – *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., в том числе и в отношении штаммов этих возбудителей, демонстрирующих множественную лекарственную устойчивость – MRSA, MRSE, VISA, VRE и т.д. Кроме того, многие грамотрицательные возбудители также демонстрируют чувствительность к тигециклину – *H. influenzae*, *Acinetobacter* spp. [10-13].

Проведенные на базе НИИ урологии исследования чувствительности основных возбудителей неспецифических инфекционно-воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы к тигециклину продемонстрировали очень высокую чувствительность к этому препарату грамположительных кокков (приближающуюся к 100%) и вполне приемлемую для эмпирического применения чувствительность грамотрицательных возбудителей – *E. coli* и *Klebsiella spp.* (85-90%). Все это позволило включить изучаемый препарат в формулярный перечень и начать его применение в клинической практике [14].

Известно, что свойства антибактериальных средств многогранны и не ограничиваются лишь воздействием на возбудителя, а также влияют на различные органы и системы макроорганизма. В настоящее время имеется большое количество публикаций, посвященных влиянию противомикробных средств на иммунную систему человека. Некоторые из иммунологических эффектов антибактериальных препаратов достаточно ярки и хорошо изучены, как, например, иммуномодулирующие свойства макролидов и нитроимидазолов, другие все еще являются предметом изучения и научной дискуссии [15].

Знание иммунологических эффектов может помочь в выборе оптимального препарата для конкретной клинической ситуации. Учет иммунологических эффектов дополняет существующие критерии выбора антибиотиков, в ряде случаев имея выраженное клиническое значение.

Целью данной работы стал анализ влияния антибактериального препарата тигециклина на фитогеммаглютининстимулированную цитокинопродукцию мононуклеарной фракцией клеток периферической крови пациентов с нормальной функцией почек и хронической почечной недостаточностью, развившейся на фоне мочекаменной болезни.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 43 пациента. Из них основную груп-

пу составил 21 больной, страдающий хроническим обструктивным пиелонефритом, осложненным хронической почечной недостаточностью II стадии (скорость клубочковой фильтрации 40-15 мл/мин по пробе Реберга) на фоне мочекаменной болезни. Клиническое обследование и лечение этих пациентов осуществлялось в стационаре НИИ урологии в 2012 г. В контрольную группу вошли 22 призывника с нормальной функцией почек, не имеющих соматических заболеваний, поступивших на обследование в городскую клиническую урологическую больницу №47 Департамента здравоохранения г. Москвы по поводу энуреза.

Иммунологические исследования, в частности, выделение мононуклеарной фракции крови, иммуноферментный анализ, проводились на кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии МБФ ГБОУ ВПО РНИМУ.

В качестве параметров для оценки состояния цитокинопродукции мононуклеарной фракцией клеток периферической крови были выбраны – фактор некроза опухолей- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкин-8 (ИЛ-8) – цитокины, обладающие способностью соответственно усиливать и ослаблять воспалительные реакции, т.е. оказывать провоспалительное и противовоспалительное действие.

Выделение мононуклеарной фракции крови осуществлялось по методу *Voym*. Все операции проводились в температурном режиме 0-40°C. Количество и жизнеспособность клеток оценивали в камере Горяева в присутствии 0,1% раствора трипанового синего. Для инкубации клеток мононуклеарной фракции периферической крови исследуемый препарат вносили в лунки 96-луночного стерильного плоскодонного планшета (COSTAR) кроме контроля так, чтобы его конечная концентрация в инкубационной среде составила от 270нг/300мкл в соответствии с *Сmax* препарата. Суспензию клеток (~1 млн/лунку) помещали в планшет и культивировали в стерильных условиях при 37°C в условиях 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов с использованием ламинарбокса ЛБ-В (Россия). При культивировании кле-

ток использовали стандартную среду DMEM с глутамином и гентамицином с добавлением 20 % термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин в концентрации 100 мкг/мл (НИИ-ЭИМ им. Н.Ф. Гамалеи). Конечный объем инкубационной среды составил 300 мкл. По окончании инкубации для анализа уровня цитокинов иммуноферментным методом отбирали по 100 мкл инкубационной жидкости из каждой лунки. Все исследования проводились в триплетах. Иммуноферментный анализ проводили согласно инструкции, прилагаемой к наборам реагентов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8 («Вектор-БЕСТ», Россия). Регистрацию результатов проводили с помощью планшетного фотометра («Униплан» АИФР-01, Россия), измеряя оптическую плотность при длине волны 530 нм 2-3 раза по 5 мин.

Статистическая обработка проводилась с помощью программного пакета GraphPad Prism 5 с использованием критерия Колмогорова-Смирнова.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень ФНО- $\alpha$  в группе пациентов, страдающих хронической почечной недостаточностью на фоне обструктивного пиелонефрита, в среднем составлял 105 пг/мл (рис. 1), что достоверно выше по сравнению с группой призывников – 51 пг/мл ( $p < 0,05$ ). На фоне инкубации мононуклеарной фракции с тигециклином в группе пациентов с хронической почечной недостаточностью на фоне мочекаменной болезни было отмечено достоверное увеличение концентрации ФНО- $\alpha$  в среднем до 132 пг/мл по сравнению с предсуществующим уровнем ( $p < 0,05$ ), а также по сравнению с мононуклеарной фракцией, выделенной из крови призывников и инкубированной с тигециклином – в среднем 45 пг/мл ( $p < 0,05$ ).

При анализе результатов в контрольной группе пациентов (призывников, страдающих энурезом) была отмечена прямо противоположная тенденция – тигециклин вызывает не рост уровня ФНО- $\alpha$ , а его снижение в среднем с 51 пг/мл

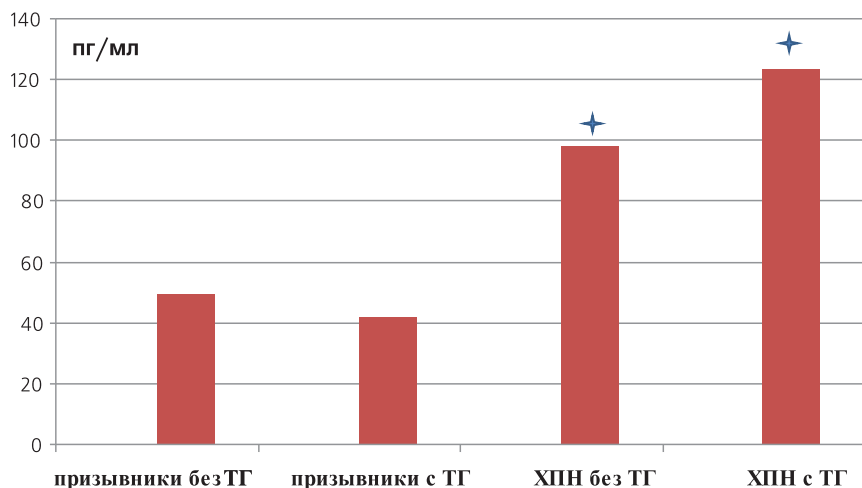


Рисунок 1. Уровень секреции ФНО- $\alpha$  мононуклеарной фракцией клеток периферической крови до и на фоне инкубации с тигециклином.

\* -  $p < 0,05$

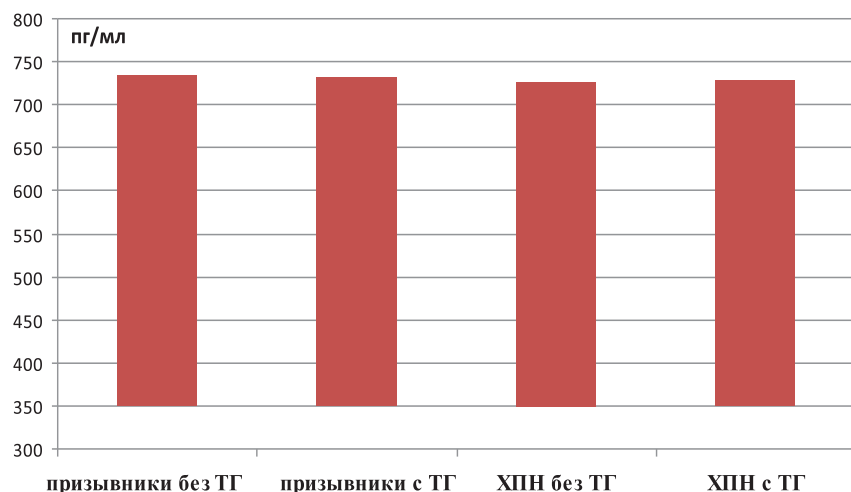


Рисунок 2. Уровень секреции ИЛ-8 мононуклеарной фракцией клеток периферической крови до и на фоне инкубации с тигециклином

до 45 пг/мл, однако изменения не достигают уровня достоверности ( $p > 0,05$ ).

Уровень ИЛ-8 у всех включенных в исследование пациентов колебался в промежутке 725-740 пг/мл, вне зависимости от почечной функции и инкубации мононуклеарной фракции с тигециклином (рис. 2). Достоверных закономерностей выявить не удалось ( $p > 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

ФНО- $\alpha$  является провоспалительным цитокином. Под его влиянием повышается активность воспа-

лительного процесса, что проявляется усилением экссудации и мобилизации нейтрофилов в очаг воспаления. Высокий уровень этого цитокина непосредственно после воздействия повреждающего фактора необходим для формирования адекватного воспалительного ответа, однако в дальнейшем его продукция должна снижаться. В противном случае воспалительная реакция протекает излишне расторможенно, со склонностью к затяжному течению и аутоиммунному повреждению тканей.

В реальной клинической практике необходимость назначения антибактериальных препаратов воз-

никает в большинстве случаев при развернутой клинической картине инфекционно-воспалительного заболевания, то есть на этапе, когда процесс экссудации в самом разгаре, а уровень ФНО- $\alpha$  закономерно высок. Следовательно, предпочтительнее, чтобы назначаемый лекарственный препарат снижал продукцию указанного цитокина. При нормальной функции почек тигециклин не оказывал достоверного влияния на уровень ФНО- $\alpha$ , отмечена лишь некоторая тенденция к подавлению его выработки, которая вряд ли может иметь клиническое значение.

У больных, страдающих почечной недостаточностью, ситуация диаметрально противоположная. Согласно литературным данным, хроническая почечная недостаточность является очень значимым фактором, снижающим уровень провоспалительных цитокинов [14, 16], хотя данное исследование в отношении ФНО- $\alpha$  это не подтверждает.

В реальной клинической практике редко встречаются пациенты с аутоиммунными заболеваниями, возникшими на фоне предсуществующей тяжелой почечной недостаточности. Поэтому для формирования адекватного воспалительного ответа уровни провоспалительных цитокинов могут оказаться недостаточными. Отсюда следует, что подавлять их выработку в этой ситуации нежелательно. Исследуемый препарат оказал достоверное стимулирующее влияние на выработку ФНО- $\alpha$ . Однако, насколько этот феномен будет иметь позитивное влияние при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний на фоне хронической почечной недостаточности, сейчас сказать сложно. Стимулировать выработку провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  необходимо в условиях его недостаточного уровня. В ситуации, когда этот уровень является нормальным или даже повышенным, продолжение стимуляции его выработки представляется сомнительным. Необходимо проведение дальнейших исследований в этом направлении.

ИЛ-8 обладает противовоспалительной активностью и является антагонистом ФНО- $\alpha$ . В условиях вы-

сокоактивного инфекционно-воспалительного процесса, когда назначается антибактериальная терапия, необходимой является стимуляция выработки этого цитокина. Согласно результатам проведенного исследования, тигециклину этот эффект не присущ как при нормальной функции почек, так и в условиях хронической почечной недостаточности.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам проведенного исследования, получены данные о стимулирующем влиянии тигециклина на выработку ФНО- $\alpha$  мононуклеарной фракцией периферической крови на фоне хронической почечной недостаточности, обусловленной мочека-

менной болезнью и хроническим пиелонефритом, что в условиях изначально сниженной выработки провоспалительных цитокинов может оказывать позитивное влияние на течение воспалительного процесса. Достоверного влияния тигециклина на секрецию противовоспалительного цитокина ИЛ-8 не отмечено. ■

**Ключевые слова:** тигециклин, фактор некроза опухолей- $\alpha$ , интерлейкин 8, хроническая почечная недостаточность, мочекаменная болезнь, обструктивный пиелонефрит.

**Key words:** tigecycline, TNF- $\alpha$ , IL-8, chronic kidney disease, urolithiasis, obstructive pyelonephritis.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева И.В., Стецюк О.У., Козлов П.С. Тигециклин: перспективы применения в клинической практике // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010. Т. 12, №2. С. 127-145.
2. Никитин А.В. Тигециклин: антимикробное действие, химиотерапевтическая эффективность и побочные реакции. // Антибиотики и химиотерапия. 2009, № 1-2. С. 63-66.
3. Галстян Г.М., Клясова Г.А., Катрыш С.А., Золотовская И.К., Галстян А.Г., Городецкий В.М. Этиология нозокомиальных пневмоний у онкогематологических больных в отделении реанимации и интенсивной терапии. // Клиническая микро-биология и антимикробная химиотерапия. 2011. № 3. С.231-240.
4. Outterson K, Samora JB, Keller-Cuda K. Will longer antimicrobial patents improve global public health? // Lancet Infect Dis. 2007. Vol. 7, № 8. P. 559-566.
5. Митрохин С.Д., Соколов А.А. Перспективы применения тигециклина в лечении инфекций области хирургического вмешательства у онкологических больных. // Антибиотики и химиотерапия. 2012. № 3. С.33-39.
6. Галстян Г.М., Дроков М.Ю., Катрыш С.А., Клясова Г.А., Гилязитдинова Е.А., Карпова Т.И., Маракуша Б.И., Тартаковский И.С. Случай подтвержденной выделением культуры Legionella pneumophila серогруппы I из бронхоальвеолярной лаважной жидкости больного легионеллезной пневмонии, лечение левофлоксацином и тигециклином. // Терапевтический архив. 2011. № 7. С.61-65.
7. Bergeron J, Ammirati M, Danley D, James L, Norcia M, Retsema J, Strick CA, Su WG, Sutcliffe J, Wondrack L. Glycylcyclines bind to the high-affinity tetracycline ribosomal binding site and evade Tet(M)- and Tet(O)-mediated ribosomal protection. // Antimicrob Agents Chemother. 1996. Vol. 40, № 9. P. 2226-2228.
8. Rasmussen BA, Gluzman Y, Tally FP. Inhibition of protein synthesis occurring on tetracycline-resistant, TetM-protected ribosomes by a novel class of tetracyclines, the glycylcyclines. // Antimicrob Agents Chemother. 1994. Vol. 38, № 7. P. 1658-1660.
9. Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, Rush TS, O'Connell J, Bradford PA. Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. // Antimicrob Agents Chemother. 2006. Vol. 50, № 6. P. 2156-2166.
10. Petersen PJ, Jacobus NV, Weiss WJ, Sum PE, Testa RT. In vitro and in vivo anti-bacterial activities of a novel glycylcycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). // Antimicrob Agents Chemother. 1999. Vol. 43, № 4. P. 738-744.
11. Sum PE, Petersen P. Synthesis and structure-activity relationship of novel glycylcycline derivatives leading to the discovery of GAR-936. // Bioorg Med Chem Lett. 1999. Vol. 17, № 10. P. 1459-1462.
12. Biedenbach DJ, Beach ML, Jones RN. In vitro antimicrobial activity of GAR-936 tested against antibiotic-resistant gram-positive blood stream infection isolates and strains producing extended-spectrum beta-lactamases. // Diagn Microbiol Infect Dis. 2001. Vol. 40, № 4. P. 173-177.
13. Tafur JD, Torres JA, Correa A, Reyes SL, Guzman AM, Ospina D. Multicenter Evaluation of In Vitro Activity of Tigecycline Against Carbapenemase Producing Gram Negative Isolates from Colombia (C1-3818). // 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) and Infectious Disease Society of America (IDSA) 46th Annual Meeting; Oct 25-28; Washington DC. 2008.
14. Яровой С.К., Лавринова Л.Н., Александров Н.С., Прохоров А.В. Чувствительность основных возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы к новому антибиотику тигециклину. // Экспериментальная и клиническая урология. 2011. №4. С.86-89.
15. Opal S, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. // Chest. 2000. Vol. 117, № 4. P. 1162-1172.
16. Карева Е.Н., Яровой С.К., Болотова Е.Н., Шимановский Н.Л. Влияние антибиотиков на цитокинопродукцию мононуклеарной фракцией клеток периферической крови пациентов с ХПН. // Экспериментальная и клиническая урология. 2010. №2. С.42-46.