

УДК 579.61

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛИ КАТЕТЕР-АССОЦИИРОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ ИММУНОСУПРЕССИИ НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО КАТИОННОГО ПЕПТИДА ВАРНЕРИНА

Литвинов В.В.

*ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия» им. ак. Е.А. Вагнера»  
Минздрава Российской Федерации, Пермь, e-mail: drlitvinov@mail.ru*

Выраженная резистентность клеточных компонентов биопленок к классическим антибиотикам требует поиска новых, альтернативных широко используемым антибактериальным препаратам соединений, способных подавлять жизнеспособность клеточных компонентов биопленок. В специальных экспериментах были получены первые результаты относительно ингибирующего действия на формирование биопленок низкомолекулярного катионного пептида варнерина, синтезируемого бактериями *Staphylococcus warneri* KL-1. Цель работы. Применение низкомолекулярного катионного пептида варнерина на модели катетер-ассоциированной инфекции с последующей морфологической оценкой состояния тканей вокруг катетера. Материалы и методы. Исследования проводились на 60 белых беспородных мышах весом 25–30 грамм, разделенных на контрольную и опытную группу. Животным обеих групп под эфирным наркозом под кожу спины имплантировали фрагмент пластикового катетера длиной 0,5 см. Всем животным внутримышечно вводили циклофосфамид в дозе 200 мг/кг. На части фрагментов катетеров в течение двух суток перед имплантацией выращивали бактериальные пленки *Staphylococcus epidermidis* 33. В опытной группе использовали низкомолекулярный катионный пептид варнерин 54 серии с активностью 1/512 тысяч условных единиц, который в виде инъекции вводили в ткани, окружающие катетер. В зависимости от предварительной обработки отрезков катетеров животные каждой группы были разделены на три подгруппы. Животных выводили из эксперимента путем передозировки эфира в первые, вторые и третьи сутки, после чего проводили гистологическое исследование тканей. Заключение. Введение варнерина в виде инъекций при отсутствии бактериального обсеменения не оказывает влияния на клеточный состав инфильтрата вокруг катетера. Применение варнерина в виде инъекций при имплантации катетеров как с предварительно выращенными биопленками, так и при ежедневном введении взвеси стафилококка в ткани, окружающие катетер, ведет к уменьшению и исчезновению колоний микроорганизмов, а также к снижению выраженности воспалительной реакции.

**Ключевые слова:** модель катетер-ассоциированной инфекции, низкомолекулярный пептид варнерин, морфология

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF CATHETER-ASSOCIATED INFECTION MODEL WHILE USING LOW-MOLECULAR-WEIGHT PEPTIDE VARNERINE IN CONDITIONS OF IMMUNOSUPPRESSION

Litvinov V.V.

*Permskaya Gosudarstvennaya Meditsinskaya Akademiya E.A. Vagnera, Perm, e-mail: drlitvinov@mail.ru*

Franked resistance of biofilms' cell component to classic antibiotics requires to search for new and alternative drugs different from widely use antibiotics which are able to suppress cells' component viability. Special experiments allowed to receive first results about inhibiting effect of low molecular weight cation peptide varnerine synthesized by *Staphylococcus warneri* KL-1 bacteria. Aim. Using of low molecular weight cation peptide varnerine on the model of catheter-associated infection with following morphological studies of tissues, surrounding the catheter. Materials and methods. Research included 60 white outbreed mice weighting 25–30 gramms, divided in control and trial groups. Animals of both groups were implanted 0,5 cm length catheters' fragments with ether anesthesia under the skin. 200 mg/kg of cyclophosphamide were also injected to each animal. Part of catheters had *Staphylococcus epidermidis* 33 bacterial films, grown 2 days before the experiment beginning. Low molecular weight cation peptide varnerine (series 54, activity – 1/512 thousand standart units) were injected in surrounding catheter tissues. Depending on previous catheter manipulation animals of each group were divided into three subgroups. Animals were deduced from the experiment by ether overdose in the first, second and third days whereupon histological examination was made. Conclusion. Varnerine injections in conditions of absence of bacterial contamination don't affect infiltrative cells around the catheters. Injections of varnerine in presence of catheters with previously grown biofilms or after everyday injections of staphylococci suspension in surrounding catheter tissues led to decreasing and evanition of moruloid and to inflammatory response decreasing.

**Keywords:** model of catheter-associated infection, low-molecular-weight peptide varnerine, morphology

Катетер-ассоциированные инфекции составляют более 60% госпитальных бактериемий в европейских странах и 11–37% всех нозокомиальных инфекций [9, 13, 6]. Стафилококки являются ведущими возбудителями катетер-ассоциированных инфекций, из них преобладают коагулазонегативные стафилококки с преобладанием *Staphylococcus*

*epidermidis* [12]. Имеется ряд доказательств наличия микробных биопленок стафилококка на установленных катетерах, причем не только в области просвета катетера, но и на внешней его стороне [7, 11].

Выраженная резистентность клеточных компонентов биопленок к антибиотикам требует поиска новых соединений,

альтернативных широко используемым антибактериальным препаратам [3].

К стратегиям подавления образования биопленок можно отнести ингибирование первого этапа их формирования – бактериального прикрепления и колонизации имплантатов за счет использования биоматериалов, импрегнированных антимикробными агентами, среди которых в качестве перспективных рассматриваются низкомолекулярные катионные пептиды [8]. В этой связи особое внимание уделяется группе лантибиотиков – низкомолекулярных катионных пептидов, одним из ярких представителей которых является Низин [1].

В специальных экспериментах были получены первые результаты относительно ингибирующего действия низкомолекулярного катионного пептида Варнерина, синтезируемого бактериями *Staphylococcus warneri* KL-1. Подавляющий эффект пептида проявлялся как на стадии образования, так и на сформированных пленках при концентрациях, превышающих минимальную ингибирующую концентрацию для планктонной культуры [2].

При разработке методов предупреждения формирования и функционирования бактериальных пленок целесообразно использование экспериментальных моделей катетер-ассоциированных инфекций. Особенно важно проведение таких исследований на фоне подавления иммунных реакций организма, которое, в частности, может быть вызвано введением циклофосфида, важнейшим эффектом которого является развитие нейтропении [10].

Патоморфологические исследования при моделировании катетер-ассоциированной инфекции для обоснования возможностей применения Варнерина не проводились и представляют большой интерес.

**Целью настоящей работы** стало применение низкомолекулярного катионного пептида варнерина на модели катетер-ассоциированной инфекции в условиях иммуносупрессии циклофосфамидом с последующей морфологической оценкой состояния тканей вокруг катетера.

#### Материалы и методы исследования

Исследования проводились на 60 белых беспородных мышах весом 25–30 грамм, разделенных на контрольную и опытную группы. Животным обеих групп под эфирным наркозом под кожу спины имплантировали фрагмент пластикового катетера длиной 0,5 см. Всем животным внутримышечно вводили циклофосфамид в дозе 200 мг/кг. На части фрагментов катетеров в течение двух суток перед имплантацией выращивали бактериальные пленки *Staphylococcus epidermidis* 33 [4]. В опытной группе использовали *низкомолекулярный*

*катионный* пептид варнерин 54 серии с активностью 1/512 тысяч условных единиц [2]. В зависимости от предварительной обработки отрезков катетеров животные каждой группы были разделены на три подгруппы.

Первой подгруппе имплантировали стерильные катетеры, и в эту же область однократно вводили 1 мл варнерина. Второй подгруппе имплантировали катетеры с предварительно выращенными на них в течение двух суток биопленками, в эту же область ежедневно вводили 1 мл варнерина. Третьей подгруппе вводили стерильные катетеры и затем в операционную рану после ее закрытия ежедневно вводили 0,5 мл взвеси стафилококка в физиологическом растворе, содержащем  $10^9$  КОЕ/мл, после чего ежедневно вводили 1 мл варнерина. Животные контрольной группы были разделены на аналогичные подгруппы, но без применения варнерина.

Животных всех групп выводили из эксперимента путем передозировки эфира в первые, вторые и третьи сутки, после чего для гистологического исследования забирали ткани вокруг катетера, которые фиксировали в 10% растворе формалина. Обработку препаратов проводили по общепринятой методике и окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону, по Броун-Хопсу.

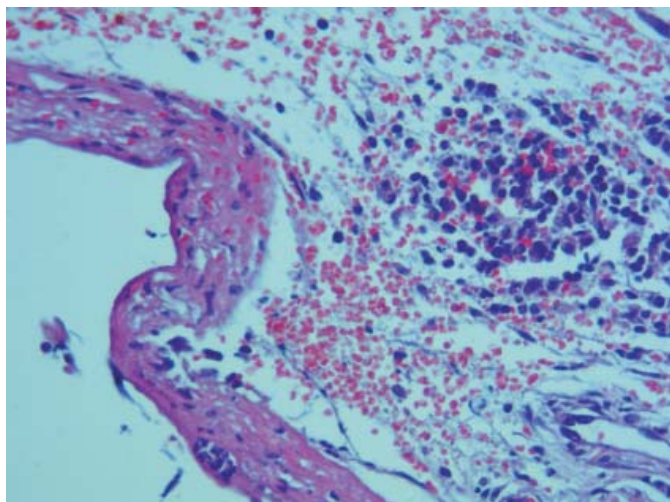
#### Результаты исследования и их обсуждение

В первой подгруппе при имплантации стерильных катетеров и однократного введения 1 мл варнерина отмечалась последовательная смена фаз воспалительного процесса вокруг катетеров в течение трех суток. В первые сутки преобладающей была лейкоцитарная фаза, которая характеризовалась наличием фибринозно-лейкоцитарной инфильтрации. На вторые сутки в инфильтрате появлялись макрофаги в большом количестве, т.е. наступала макрофагальная фаза. На третьи сутки регистрировалось большое количество грануляционной ткани с наличием фибробластов и тонких коллагеновых волокон, т.е. наступала фибропластическая фаза. Данная картина и сроки смены фаз характерны для развития воспалительных реакций на инородное тело в коже у мышей [5]. При этом значимых отличий в клеточном составе и морфологии окружающих катетер тканей при введении варнерина не было выявлено (рис. 1).

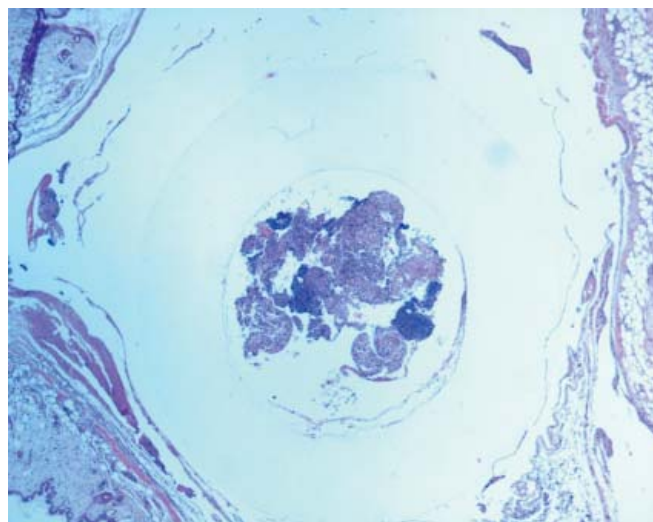
Во второй подгруппе при имплантации катетеров с предварительно выращенными на них двухсуточными биопленками и ежедневном введении варнерина в протекании фаз воспаления имелись следующие особенности. В первые сутки отмечался отек и повышенное кровенаполнение окружающих катетер тканей с выпадением фибрина. Инфильтрат был представлен макрофагами и лимфоцитами. На вторые сутки фибрин обнаруживался не только снаружи, но и в просвете катетера. Отмечалось очаговое

скопление клеток – лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов с образованием «гнояных телец» и скоплений микроорганизмов. По

периферии катетера обнаруживались единичные нейтрофилы, макрофаги, фибробласты (рис. 2).



*Рис. 1. Грануляционная ткань, слой фибрина и очаговая инфильтрация макрофагами, лимфоцитами и фибробластами вблизи имплантированного стерильного катетера после однократного введения 1 мл варнерина в окружающие ткани. Третьи сутки (Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ )*



*Рис. 2. Скопления микроорганизмов, фибрин внутри и вокруг катетера при имплантации катетеров с предварительно выращенными на них двухсуточными биопленками и ежесуточном введении 1 мл варнерина. Вторые сутки (Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 10$ )*

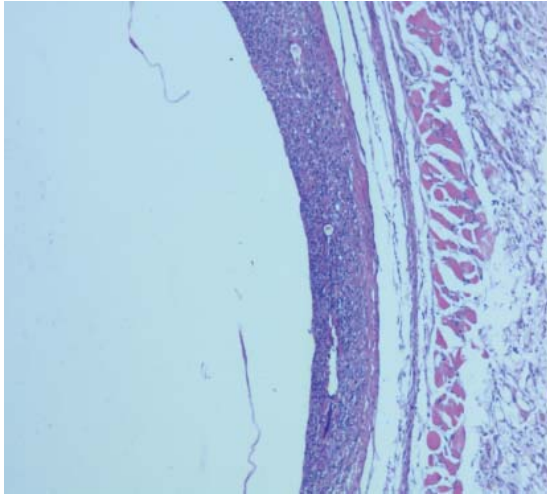
На третьи сутки воспалительный инфильтрат был представлен единичными лимфоцитами, макрофагами, нейтрофилами, а фибробласты формировали ограниченный вал вокруг катетера.

По сравнению с аналогичной подгруппой без использования варнерина при его ежесуточном введении в область имплантации катетера с биопленками отмечается исчезновение скопления микроорганизмов и уменьшение объема воспалительного ин-

фильтрата. Данная тенденция особенно выражена со вторых суток.

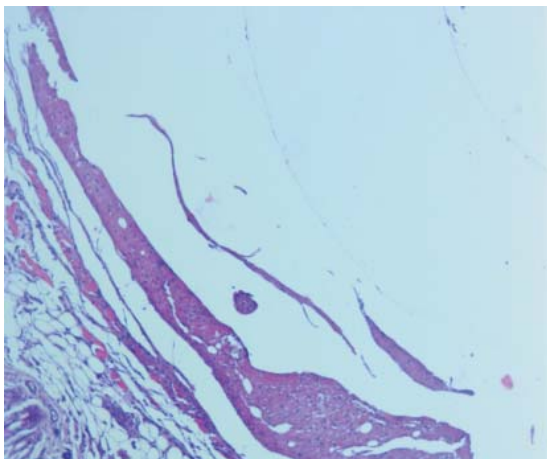
В третьей подгруппе с ежесуточным введением взвеси стафилококка в зону имплантации катетера и последующим ежесуточным введением 1 мл варнерина протекание фаз воспаления имело следующие особенности. Уже на первые сутки в лейкоцитарную фазу отмечалось скопление микроорганизмов на поверхности катетера, по периферии отмечалось формирование

воспалительного инфильтрата из нейтрофилов, макрофагов и фибрина с формированием микроабсцесса. На вторые сутки морфологическая картина оставалась прежней с тенденцией к уменьшению объема скоплений микроорганизмов (рис. 3).



*Рис. 3. Скопление микроорганизмов, фибрин и воспалительный инфильтрат из нейтрофилов и макрофагов при ежесуточном введении взвеси стафилококка в зону имплантации катетера и с последующим ежесуточным введением туда же 1 мл варнерина. Вторые сутки (Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ )*

На третьи сутки в инфильтрате появились фибробласты, синтезирующие коллаген, и обилие лимфоцитов. При этом объем воспалительного инфильтрата и скопления микроорганизмов уменьшались (рис. 4).



*Рис. 4. Широкая зона фибрина, небольшие скопления микроорганизмов вокруг катетера при ежесуточном введении взвеси стафилококка в зону имплантации катетера и с последующим ежесуточным введением туда же 1 мл варнерина. Третья группа, третьи сутки (Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ )*

По сравнению с аналогичной подгруппой без использования варнерина при его ежесуточном введении в область имплантации катетера на фоне массивного бактериального обсеменения также отмечается тенденция к уменьшению объема воспалительного инфильтрата и скоплений микроорганизмов.

### Выводы

1. Введение в виде инъекции в зону имплантации стерильного катетера низкомолекулярного катионного пептида варнерина не оказывает влияния на клеточный состав инфильтрата вокруг катетера.

2. Применение низкомолекулярного катионного пептида варнерина в виде инъекций при имплантации катетеров как с предварительно выращенными биопленками, так и при ежесуточном введении взвеси стафилококка в ткани, ведет к уменьшению и исчезновению скоплений микроорганизмов, а также к снижению выраженности воспалительной реакции.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 12-04-01431.*

### Список литературы

1. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полудова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Микробиология. – 2010. – Т.79, № 2. – С. 228–238.
2. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полудова Т.В. Варнерин – новый лантионинсодержащий пептид: структура, свойства, антибактериальное действие // Вестник Пермского научного центра Уральского отделения РАН. – 2009. – № 4. – С. 22–26.
3. Коробов В.П., Полудова Т.В., Лемкина Л.М. Пептидные факторы микробного антагонизма – природные антибиотики широкого спектра действия // Пермский медицинский журнал. – 2005. – Т. 22, № 1. – С. 134–144.
4. Литвинов В.В., Лемкина Л.М., Фрейд Г.Г., Коробов В.П. Экспериментальные подходы к созданию модели катетер-ассоциированной инфекции, обусловленной биопленками стафилококков // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. – Т. 38, № 4. – С. 105–106.
5. Майборода А.А. Динамическая структура очага воспаления // Морфофизиологические критерии адаптивных состояний: сб. – Иркутск, 1979. – С. 38–49.
6. Bouza E., San Juan R., Munoz P., Pascau J., Voss A., Desco M.A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology, workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study) // Clin. Microbiol. Infect. – 2004. – Vol. 10. – P. 838–842.
7. Donlan R. M. Biofilms: microbial life on surfaces // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 8. – P. 381–390.
8. Fontana M.B.C., Bastos M.C., Brandelli A. Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit Staphylococcus epidermidis adhesion to catheters // Curr. Microbiol. – 2006. – Vol. 52. – P. 350–353.
9. Mermel L., Farr B., Sheretz R. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 32. – P. 1249–1272.
10. Levine A.S., Schimpf S.C., Graw R.G., Young R.C. Hematologic malignancies and other marrow failure states:

progress in the management of complicating infections // *Semin. Hematol.* – 1974. – Vol. 11. – P. 141–202.

11. O Toole G. A. To build a biofilm // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – P. 2687–2689.

12. Safdar N., Maki D.G. The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short-term central venous catheters // *Inten. Care Med.* – 2004. – Vol. 30. – P. 62–67.

13. Warren D.K., Zack J.E., Elward A.M., Cox M.J., Fraser V.J. Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 33. – P. 1329–1335.

### References

1. Korobov V.P., Lemkina L.M., Polyudova T.V., Akimenko V.K. Vydelenie i harakteristika novogo nizkomolekuljarnogo antibakterial'nogo peptida semejstva lantibiotikov. *Mikrobiologija*, 2010, T.79, no. 2, pp. 228–238.

2. Korobov V.P., Lemkina L.M., Polyudova T.V. Varnerin – novyj lantioninsoderzhashhij peptid: struktura, svojstva, antibakterial'noe dejstvie. *Vestnik Permskogo nauchnogo centra Ural'skogo otdelenija RAN*, 2009, no. 4, pp. 22–26.

3. Korobov V.P., Poljudova T.V., Lemkina L.M. Peptidnye faktory mikrobnogo antagonizma – prirodnye antibiotiki shirokogo spektra dejstvija. *Permskij medicinskij zhurnal*, 2005, T. 22, no. 1, pp. 134–144.

4. Litvinov V.V., Lemkina L.M., Freynd G.G., Korobov V.P. Jeksperimental'nye podhody k sozdaniju modeli kateeter-associrovannoj infekcii obuslovlennoj bioplenkami stafilokokkov. *Vestnik ural'skoj medicinskoj akademicheskoj nauki*. 2011. T. 38, no. 4. pp. 105–106.

5. Majboroda A.A. Dinamicheskaja struktura ochaga vospalenija. *Sb. «Morfofiziologicheskie kriterii adaptivnyh sostojanij»*, Irkutsk, 1979, pp. 38–49.

6. Bouza E., San Juan R., Munoz P., Pascau J., Voss A., Desco M. A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology, workload, etiol-

ogy and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study) // *Clin. Microbiol. Infect.* 2004. Vol. 10. pp. 838–842.

7. Donlan R. M. Biofilms: microbial life on surfaces // *Emerg. Infect. Dis.* 2002. Vol. 8. pp. 381–390.

8. Fontana M.B.C., Bastos M.C., Brandelli A. Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit *Staphylococcus epidermidis* adhesion to catheters // *Curr. Microbiol.* 2006. Vol. 52. pp. 350–353.

9. Mermel L., Farr B., Sheretz R. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections // *Clin. Infect. Dis.* 2001. Vol. 32. pp. 1249–1272.

10. Levine A.S., Schimpf S.C., Graw R.G., Young R.C. Hematologic malignancies and other marrow failure states: progress in the management of complicating infections // *Semin. Hematol.* 1974. Vol. 11. pp. 141–202.

11. O Toole G. A. To build a biofilm // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185. pp. 2687–2689.

12. Safdar N., Maki D.G. The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short-term central venous catheters // *Inten. Care Med.* 2004. Vol. 30. pp. 62–67.

13. Warren D.K., Zack J.E., Elward A.M., Cox M.J., Fraser V.J. Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study // *Clin. Infect. Dis.* 2001. Vol. 33. pp. 1329–1335.

### Рецензенты:

Лебединская О.В., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Пермской государственной медицинской академии им. ак. Е.А. Вагнера, г. Пермь;

Карпунина Т.И., д.м.н., профессор кафедры микробиологии Пермской государственной медицинской академии им. ак. Е.А. Вагнера, г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 18.04.2014.