

## Морфологическая характеристика экспериментальной катетер-ассоциированной инфекции на фоне иммуносупрессии и применения низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков – варнерина

В.В. Литвинов<sup>1</sup>, Л.М. Лемкина<sup>2</sup>, Г.Г. Фрейнд<sup>1</sup>, В.П. Коробов<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

**Введение.** Развитие катетер-ассоциированной инфекции связано с колонизацией микроорганизмами поверхности имплантированного катетера путем формирования биопленки, что значительно повышает их устойчивость к антисептикам и антибиотикам, особенно в условиях иммуносупрессии. Одним из классов соединений, способных справляться с биопленкообразованием, являются низкомолекулярные антибактериальные пептиды. Цель исследования – морфологическая характеристика модели катетер-ассоциированной инфекции у лабораторных мышей на фоне иммуносупрессии с оценкой эффективности использования антибактериального низкомолекулярного катионного пептида варнерина.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на белых беспородных мышах весом 25–30 граммов, которым под кожу спины были имплантированы фрагменты внутрисудистых катетеров длиной 1,0 см. Предварительно животным проводили иммуносупрессию циклофосфамидом. В экспериментах использовали бактерии *Staphylococcus epidermidis* 33 в виде их взвесей или биопленок, предварительно выращенных на отрезках катетеров, и препарат низкомолекулярного катионного пептида варнерина. Животных всех групп выводили из экспериментов путем передозировки эфира на 1-е, 2-е и 3-и сутки, после чего проводили забор мягких тканей вокруг катетеров для гистологических и иммуногистохимических исследований с использованием антител к CD34, виментину, CD68, CD3 и CD20.

**Результаты.** Введение варнерина в область имплантации катетеров приводило к исчезновению или значительному уменьшению скоплений бактерий в этих зонах, также в инфильтратах отмечалось статистически значимое увеличение количества нейтрофилов и уменьшение содержания фибробластов. Особенности клеточных реакций вокруг катетеров с бактериальной обсемененностью при введении варнерина подтверждены иммуногистохимически.

**Заключение.** При формировании модели катетер-ассоциированной инфекции в условиях иммуносупрессии антибактериальная эффективность низкомолекулярного катионного пептида варнерина проявляется в характерных морфологических изменениях состава воспалительного инфильтрата вокруг инфицированных отрезков катетеров.

**Ключевые слова:** моделирование катетер-ассоциированной инфекции, морфология воспаления, антибактериальный низкомолекулярный катионный пептид варнерин

**Для корреспонденции:** Валерий Викторович Литвинов. E-mail: drlitvinov@mail.ru

**Для цитирования:** Литвинов В.В., Лемкина Л.М., Фрейнд Г.Г., Коробов В.П. Морфологическая характеристика экспериментальной катетер-ассоциированной инфекции на фоне иммуносупрессии и применения низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков – варнерина. Клин. эксп. морфология. 2021;10(4):14–24. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.14-24.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» (№ АААА-А19-119112290009-1) с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Исследования материалов и вещества» Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.05.2021. Получена после рецензирования 03.06.2021. Принята в печать 15.06.2021.

## Morphological characteristics of an experimental catheter-associated infection following immunosuppression and the use of a low-molecular cationic peptide of the lantibiotic family – warnerin

V.V. Litvinov<sup>1</sup>, L.M. Lemkina<sup>2</sup>, G.G. Freynd<sup>1</sup>, V.P. Korobov<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University of Ministry of Health of Russia, Perm, Russia

<sup>2</sup> Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

<sup>3</sup> Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

**Introduction.** Catheter-associated infection is caused by microorganism colonization of the surface of the implanted catheter with a biofilm formation that significantly increases their resistance to antiseptics and antibiotics, especially in immunosuppression. Low-molecular antibacterial peptides are compounds capable of combating biofilm formation. The aim of the study was to describe morphological characteristics of a catheter-associated infection model on laboratory mice secondary to immunosuppression and to assess the efficacy of the low-molecular cationic antibacterial peptide (warnerin).

**Materials and methods.** An experiment included white outbred mice (25–30 g body weight) under ether anesthesia that received 1.0-cm fragments of intravascular catheters under the skin of the backs. The animals underwent preliminary immunosuppression with cyclophosphamide. We used *Staphylococcus epidermidis* 33 (in the form of suspensions or biofilms previously grown on catheter segments) and low-molecular cationic peptide warnerin. All animals were sacrificed by ether overdose on days 1, 2, and 3 after the manipulation. We took the tissues surrounding the catheter for histological and immunohistochemical studies with antibodies to CD34, vimentin, CD68, CD3, and CD20.

**Results.** The warnerin administration at the site of the catheter implantation led to disappearance of or a significant decrease in the number of bacterial. In the infiltrate, the number of neutrophils significantly increased, whereas that of fibroblasts decreased. Immunohistochemistry confirmed the features of the cellular reactions around the catheters with bacterial contamination with warnerin administration.

**Conclusion.** In a model of catheter-associated infection in immunosuppressed mice, the warnerin antibacterial manifests in characteristic histological alterations in the inflammatory infiltrate composition.

**Keywords:** catheter-associated infection model, morphology of inflammation, warnerin antibacterial cationic peptide

**Corresponding author:** Valeriy V. Litvinov. E-mail: drlitvinov@mail.ru

**For citation:** Litvinov V.V., Lemkina L.M., Freynd G.G., Korobov V.P. Morphological characteristics of an experimental catheter-associated infection following immunosuppression and the use of a low molecular cationic peptide of the lantibiotic family – warnerin. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):14–24. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.14-24 (In Russ.).

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment on the topic “Molecular mechanisms of adaptation of microorganisms to environmental factors” (No. AAAA-A19-119112290009-1) using the equipment of Center for Collective Use Research of Materials and Substances, Perm Federal Research Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 20.05.2021. **Received in revised form** 03.06.2021. **Accepted** 15.06.2021.

### Введение

Неуклонный рост катетеризации центральных вен характеризуется увеличением числа осложнений, среди которых наиболее часты катетер-ассоциированные инфекции (КАИ) [1, 2]. Эти осложнения определяют необходимость проведения дорогостоящего лечения в отделениях реанимации и интенсивной терапии, уступая по частоте образования только пневмониям и инфекциям брюшной полости [3].

Основная причина КАИ (до 90% случаев) – распространение микроорганизмов кожных покровов по наружным поверхностям вдоль каналов установленных катетеров. Преобладают в составе микрофлоры кожи коагулазонегативные стафилококки, среди которых на протяжении многих лет доминирующими возбуди-

телями КАИ являются бактерии вида *Staphylococcus epidermidis* [4–6]. Непосредственная колонизация поверхности имплантированных катетеров осуществляется путем формирования микроорганизмами биопленок, в составе которых устойчивость бактерий к действию факторов внешней среды значительно повышается, в том числе к антисептикам и антибиотикам. Показано, что спустя 10–14 дней после установки катетеров около 15% их поверхности покрывается биопленками, а через 30 дней этот показатель достигает уже 40% и бактериальные пленки начинают формироваться в том числе интралюминально [7].

Сформированная биопленка характеризуется наличием двух фаз – малоподвижной, состоящей из делящихся бактериальных клеток и межклеточного матри-

са, и планктонной, которая ответственна за развитие клинических проявлений инфекции [8, 9]. Поздние кластеры бактерий могут отделяться от биопленки и способствовать развитию сепсиса, частота которого у пациентов с КАИ достигает от 15 до 55% [3, 10]. Наиболее часто сепсис развивается у иммунокомпрометированных пациентов, которых постоянно становится больше в связи с развитием медицинских технологий (диализ, химиотерапия, трансплантация органов) и ростом числа социально значимых заболеваний (ВИЧ-инфекция, наркомания, алкоголизм) [1–3, 5, 10]. Особенно высок риск развития КАИ у новорожденных с незрелой иммунной системой – он значительно выше, чем у взрослых (9,6 и 4,6 случая на 1000 катетер/дней, соответственно) [11, 12].

Моделирование КАИ чаще всего проводят на лабораторных мышах, реже на крысах и кроликах. Разработаны различные способы моделирования КАИ. Наиболее часто отрезок катетера помещают подкожно в область спины, боковой поверхности брюшка животных или внутрибрюшинно [13, 14]. В ряде работ использовано расширенное моделирование КАИ путем установки катетера в просвет сосуда лабораторного животного [15, 16]. Исследования с характеристикой локальных морфологических изменений мягких тканей вокруг катетеров немногочисленны [13, 14], что определяет необходимость изучения реакций макроорганизма на их внедрение. При этом следует отметить, что имеющиеся данные об особенностях развития катетер-ассоциированных инфекций у иммунокомпрометированных пациентов, а также высокий регенераторный потенциал таких лабораторных животных как мыши свидетельствуют о необходимости и целесообразности проведения моделирования КАИ с использованием иммуносупрессии. Проведенные нами ранее эксперименты по моделированию КАИ у мышей при иммуносупрессии циклофосфамидом выявили более выраженный рост скоплений микроорганизмов с меньшей выраженностью и более четким разделением суточных фаз воспаления, что в итоге позволило более полно оценить морфологические проявления воспаления в зонах имплантации отрезков катетера. Это стало обоснованием проведения дальнейшего моделирования КАИ на фоне иммуносупрессии [17].

Исследованиями последних лет показано, что одним из классов соединений, способных справляться с биопленкообразованием на поверхностях катетеров, являются низкомолекулярные антибактериальные пептиды (АБП), которые продуцируются микроорганизмами для подавления ближайшего бактериального окружения [18, 19]. Особенности молекулярной структуры позволяют АБП взаимодействовать с биологическими мембранами, содержащими молекулы с амфипатическими свойствами, а также с отрицательно заряженными поверхностными структурами бактерий [20, 21]. Клетки животных имеют мембраны со слабо выра-

женным поверхностным зарядом, и, следовательно, с ними АБП практически не взаимодействуют [22]. Показано, что АБП не только проявляют свое литическое действие в отношении планктонных культур, но и способны разрушать уже сформировавшиеся бактериальные пленки, в частности стафилококков [20, 23]. Кроме того, выявлено, что некоторые АБП оказываются особенно эффективными на начальном этапе образования биопленок [19, 21, 24]. Учитывая естественное происхождение этих соединений, а также механизм их антибактериального действия, следует отметить низкую частоту формирования к ним резистентности [19, 21, 25].

Недавно сотрудниками Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН выделен новый антибактериальный пептид семейства лантибиотиков – варнерин (патент № 2200195, 2003 год). Пептид синтезируется и выделяется в среду культивирования коагулазонегативными стафилококками вида *Staphylococcus warneri* IEGMKL-1. Изучены биохимические свойства пептида и его антибактериальное действие на чувствительные и антибиотикорезистентные штаммы *S. epidermidis* [26].

При моделировании КАИ с предварительной обработкой отрезков стерильных катетеров варнерином и их дальнейшей подкожной имплантацией лабораторным животным было установлено, что варнерин существенно влияет на процессы регенерации, вероятно, за счет своих хемоаттрактантных свойств, описанных ранее у других АБП [17]. В связи с этим сведения об антибактериальном действии варнерина в условиях *in vivo* представляют особый интерес.

Цель исследования – представить морфологическую характеристику модели катетер-ассоциированной инфекции у лабораторных мышей на фоне иммуносупрессии с оценкой эффективности использования низкомолекулярного катионного антибактериального пептида варнерина для подавления инфицирования имплантированного материала.

## Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 24 самцах белых беспородных мышей массой 25–30 граммов. Животных содержали в виварии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН по одной особи в клетке при температуре +18–25°C, естественном освещении, свободном доступе к воде и пище. Все манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Исследование одобрено локальным этическим комитетом Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера (протокол № 3 от 25 марта 2015 года). Процессы формирования бактериями *Staphylococcus epidermidis* 33 биопленок путем инкубации отрез-

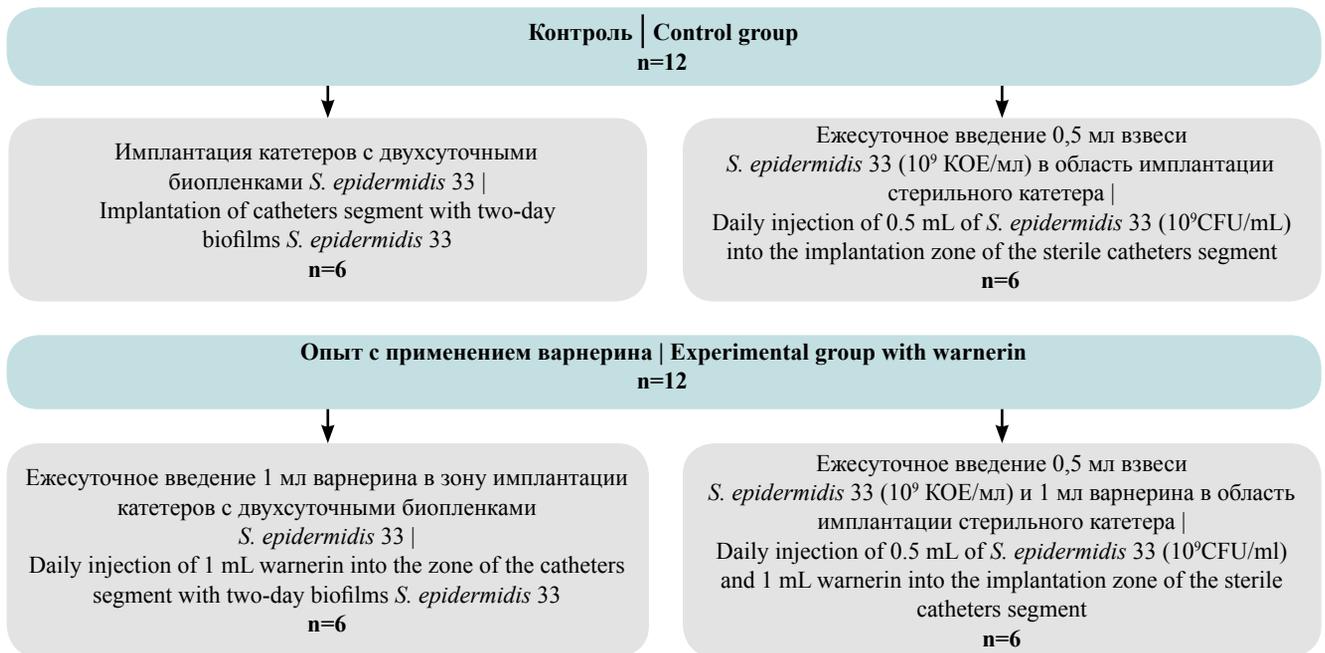


Рис. 1. Схема моделирования катетер-ассоциированной инфекции  
Fig. 1. Scheme for modeling a catheter-associated infection

ков катетеров в их суспензиях ( $10^9$  КОЕ/мл) в течение 48 часов при температуре  $37^\circ\text{C}$  предварительно были изучены на венозных катетерах разных фирм. Результаты этих исследований показали, что формирование бактериальных пленок наиболее интенсивно проявлялось на тефлоновых катетерах фирмы Arxmed International (Нидерланды). Это послужило основой выбора катетеров данного производителя для использования в экспериментах на животных.

Для иммуносупрессии до проведения имплантации катетеров животным внутримышечно вводили циклофосфамид («ВЕРОФАРМ», Россия) в дозе 200 мг/кг ежедневно в течение 5 суток. Выбор данной дозы был обусловлен наибольшим изменением массы вилочковой железы у мышей того же веса и возраста, выявленным нами в предварительных экспериментах.

В экспериментах использовали препарат низкомолекулярного катионного пептида варнерина серии 54 (лаборатория биохимии развития микроорганизмов ИЭГМ УроРАН, патент № 2200195 от 2003 года) с активностью 512 000 условных единиц (128 мг/мл).

Животных разделили на две группы по 12 особей каждая: контрольная группа – мыши без применения пептида и опытная группа – мыши, которым вводился варнерин (рис. 1). Для имплантации отрезков катетеров у наркотизированных животных (внутрибрюшинное введение 20% раствора ксилазина – Interchemie, Нидерланды, 0,15 мл на 1 кг веса) сбрасывали шерсть на участке спины и глазным скальпелем делали им прокол кожи. В образовавшийся раневой канал под кожу имплантировали фрагменты пластиковых катетеров длиной 1,0 см, кожные дефекты заклеивали медицинским клеем БФ-6 («Вертекс», Россия).

В контрольной группе части животных ( $n=6$ ) подкожно вводили отрезки катетеров со сформированными на них *in vitro* био пленками *S. epidermidis* 33, а другой части животных ( $n=6$ ) – отрезки стерильных катетеров с последующим ежесуточным инъецированием в операционные раны суспензий бактерий *S. epidermidis* 33 в объеме 0,5 мл, содержащей  $10^9$  КОЕ/мл.

В опытной группе животных разделили на подгруппы аналогично контрольной, но дополнительно в место имплантации отрезков катетеров подкожно ежесуточно в одно и то же время трое суток подряд вводили стерильный водный раствор варнерина в объеме 1 мл.

Животных всех групп выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза в конце 1-х, 2-х и 3-х суток (по две особи в конце каждых суток из каждой группы). Во время проведения экспериментов число животных оставалось постоянным. Для проведения гистологических исследований забирали участки тканей вокруг отрезков катетеров, которые фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов. Обработку препаратов проводили по общепринятой методике, окрашивая их гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону и по Броун–Хопксу для выявления скоплений микроорганизмов.

На готовых гистологических срезах (6–8 срезов от каждого животного из разных зон отрезка катетера) на световом уровне при увеличении микроскопа  $\times 400$  или  $\times 1000$  оценивали общую морфологическую картину окружающих катетер тканей. При проведении морфометрического анализа, выполненного с использованием программы ImageJ 1.42, в образцах просматривали по 10 полей зрения, оценивая соотношения различных типов клеток с использованием закрытой тестовой

системы из 25 точек. Количество и видовой состав клеточных элементов анализировали с определением макрофагально-гранулоцитарного коэффициента, оценивая соотношение числа макрофагов к числу нейтрофильных гранулоцитов в инфильтрате.

При проведении иммуногистохимического исследования использовали стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод и соответствующий набор детекции (Diagnostic BioSystems, США). Срезы инкубировали во влажной камере в течение 60 минут при температуре +37°C с моноклональными антителами к маркеру прогениторных клеток (CD34 – Diagnostic BioSystems, США), виментину (Vimentin – Spring Bioscience, США), рецепторам макрофагов (CD68 – Diagnostic BioSystems, США), рецепторам Т-лимфоцитов (CD3 – Diagnostic BioSystems, США) и рецепторам В-лимфоцитов (CD20 – Diagnostic BioSystems, США).

В связи с особенностями исследуемого материала (воспалительный инфильтрат в ткани вокруг пластикового катетера) результаты иммуногистохимического исследования оценивались полуколичественным методом на основании наличия или отсутствия положительной окраски соответствующих клеточных элементов инфильтрата и тканей вокруг катетера: положительный результат оценивали знаком +, отрицательный знаком –, а промежуточный, соответственно, знаком ±.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи. Сравнение значений исследуемых показате-

лей между группами животных проводили при помощи непараметрического рангового однофакторного критерия Краскела–Уоллиса, попарные сравнения – с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При имплантации катетеров с предварительно выращенными на них бактериальными пленками ежедневное введение животным варнерина со 2-х суток приводило к исчезновению скоплений микроорганизмов, возрастанию относительного содержания нейтрофилов в инфильтрате с уменьшением макрофагально-гранулоцитарного коэффициента, а также достоверному уменьшению количества фибробластов ( $p = 0,00776$ ), чего не наблюдалось в аналогичной подгруппе без использования варнерина (табл. 1, рис. 2, 3). Иммуногистохимически на 3-и сутки в прилегающих к отрезкам катетеров зонах тканей не выявлялись Т- и В-лимфоциты, отсутствовала реакция на CD34, а реакция на виментин была слабоположительной, что также не наблюдалось и в группе без применения варнерина (табл. 2).

Увеличение количества нейтрофильных гранулоцитов в инфильтратах связано с хемотаксическим эффектом остатков клеточных стенок бактерий, лизированных под влиянием варнерина. Известно, что антибактериальные пептиды могут способствовать секвестрации липополисахаридов бактерий [20, 21],

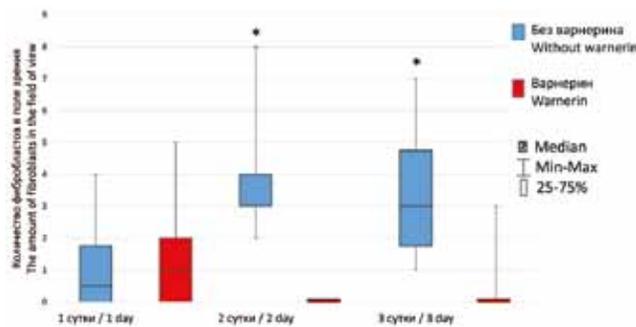


Рис. 2. Изменение количества фибробластов в клеточном инфильтрате при имплантации отрезков катетеров со сформированными на них биопленками бактерий *S. epidermidis* 33 и ежедневном введении низкомолекулярного катионного пептида варнерина  
\* Различия достоверны между группами животных с применением варнерина и без его использования ( $p < 0,05$ )

Fig. 2. Changes in the number of fibroblasts in the cell infiltrate during implantation of catheter segments with *S. epidermidis* 33 bacterial biofilms formed on them and daily administration of a low-molecular cationic peptide warnerin

\* The differences are significant between the groups of animals with and without warnerin administration ( $p < 0,05$ )

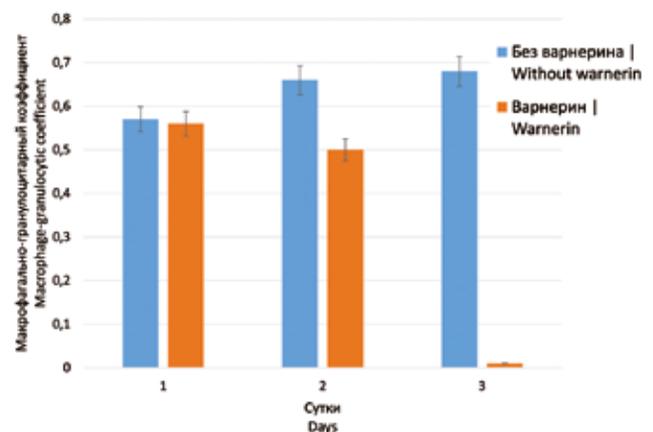


Рис. 3. Изменение макрофагально-гранулоцитарного коэффициента при имплантации отрезков катетеров с биопленками стафилококков и ежедневном введении низкомолекулярного катионного пептида варнерина

Fig. 3. Change in macrophage-granulocyte coefficient upon implantation of catheter segments with staphylococcal biofilms and daily administration of a low-molecular cationic peptide warnerin

Таблица 1 | Table 1

**Изменения абсолютного и процентного соотношения клеточного состава инфильтрата  
окружающих отрезки катетеров тканей в экспериментальных группах животных, Me (0,25; 0,75) |  
Changes in the absolute and relative numbers of the composition of cellular infiltrate in the tissues surrounding  
the catheter in experimental groups, Me (0.25; 0.75)**

Группы   Groups	Сутки   Day	n	A/R	Клеточные элементы Me (0,25; 0,75)   Cells Me (0.25; 0.75)				
				макрофаги   macrophages	нейтрофилы   neutrophils	фибробласты   fibroblasts	лимфоциты   lymphocytes	М/Г   M/G
<b>Контроль   Control group</b>								
Катетеры с биопленками   Catheters segment with biofilms	1	2	A	3 (2,25–3,75)	4,5 (2,25–10,5)	0,5 (0–1,75)	1,5 (1–2,75)	
			R	26 (16–27,75)	45 (30,25–59)	2,5 (0–15,5)	22,5 (8,25–42)	0.57
	2	2	A	2 (2–2)	3 (2–3)	3 (3–4)	2 (2–2)	
			R	20 (10–22)	30 (18–33)	30 (18–45)	17 (17–18)	0.66
	3	2	A	1,5 (1–3,75)	2,5 (1,75–3,75)	3 (1,75–4,75)	4,5 (2,25–6,5)	
			R	16 (7–30,5)	23,5 (18,25– 26,75)	30 (11,75–47)	28 (12–44,25)	0.68
Ежесуточное введение стафилококка в область катетера   Daily staphylococci injection into the catheter zone	1	2	A	2,5 (1,25–3,75)	1 (1–2,5)	1 (0,25–1)	2,5 (1,25–3)	
			R	35,5 (33–41,75)	23,5 (12,5–35,25)	9,5 (1,75–13,5)	36 (19–38)	1.51
	2	2	A	2 (1–3)	0 (0–2)	1 (1–1)	0 (1–1)	
			R	40 (33–50)	0 (0–40)	20 (11–50)	0 (0–11)	-
	3	2	A	2 (0,75–3,75)	1 (0–1,25)	2 (0–3)	0,5 (0–4)	
			R	32 (18,75–42,5)	11 (4,5–35,5)	16,5 (0–32,75)	6 (0–28,75)	2.9
<b>Опыт с применением варнерина   Experimental group with warnerin</b>								
Ежесуточное введение варнерина в область катетера с биопленками   Daily warnerin injection into the catheter segment zone with biofilm	1	2	A	1 (1–1)	2 (1–4,25)	1 (0–2)	1 (0–2,25)	
			R	18,5 (8–30)	33 (25–57,75)	10,5 (0–30)	23,5 (0–35)	0.56
	2	2	A	1 (0,5–1,5)	3 (1,5–4)	<b>0 (0–0)*</b>	1 (0,5–1,5)	
			R	25 (3,5–29)	50 (41,5–68,5)	0 (0–0)	20 (6–25)	0.5
	3	2	A	0 (0–1,75)	2,5 (1–3)	<b>0 (0–1)*</b>	1 (0–1)	
			R	0 (0–28,25)	50 (21,25–71,25)	0 (0–22)	17 (0–25)	0
Ежесуточное введение стафилококка и варнерина в область катетера   Daily staphylococci and warnerin injection into the catheter zone	1	2	A	1 (0,25–1,75)	4 (1,5–6,75)	0 (0–1)	0 (1,5–2,75)	
			R	10,5 (2–20)	66,5 (30–77,25)	0 (0–17)	15,5 (0–23,75)	0.16
	2	2	A	1,5 (0,75–2)	4,5 (3,5–6,25)	0 (0–1,5)	1,5 (0–2,5)	
			R	13,5 (8,25–16,25)	61,5 (50–72)	0 (0–15,25)	18,5 (0–29,25)	0.22
	3	2	A	1 (0,25–1,75)	<b>2,5 (1,25–5)*</b>	0 (0–1)	2 (2–3)	
			R	15 (2,75–20)	42 (22,75–59,25)	0 (0–13,75)	34 (25–42,25)	0.35

\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с аналогичными сутками аналогичной подгруппы без применения варнерина

n – число исследуемых животных

A – абсолютное количество клеточных элементов

R – относительное количество клеточных элементов

M/G – макрофагально-гранулоцитарный коэффициент

\*  $p \leq 0.05$  compared to the similar subgroup without warnerin administration on the same day

n – the number of laboratory animals

A – absolute number of cellular elements

R – relative number of cellular elements

M/G – macrophage-granulocytic coefficient

**Иммуногистохимические реакции окружающих отрезков катетера тканей в экспериментальных группах животных | Immunohistochemical reactions in tissues surrounding the catheter segment in experimental groups**

Группы   Groups	Сутки   Day	ИГХ маркеры   IHC markers				
		CD68	CD34	CD3	CD20	Vimentin
<b>Группа без применения варнерина   Control group without warnerin</b>						
Катетеры с биопленками   Catheters with biofilms	1	+	+	–	+	+
	2	+	+	±	+	+
	3	+	+	±	+	+
Ежесуточное введение стафилококка в область катетера   Daily staphylococci injection into the catheter zone	1	+	+	–	+	+
	2	+	+	±	+	+
	3	+	+	+	+	+
<b>Группа с применением варнерина   Experimental group with warnerin</b>						
Ежесуточное введение варнерина в область катетера с биопленками   Daily warnerin injection into the catheter zone with biofilms	1	+	+	–	±	+
	2	+	+	–	–	+
	3	+	–	–	–	±
Ежесуточное введение стафилококка и варнерина в область катетера   Daily staphylococci and warnerin injection into the catheter zone	1	+	+	+	±	+
	2	+	+	+	–	+
	3	+	+	±	+	+

+ наличие окрашивания соответствующих клеточных или тканевых элементов инфильтрата вокруг катетера  
 – отсутствие окрашивания соответствующих клеточных или тканевых элементов инфильтрата вокруг катетера  
 ± промежуточный результат

+ the presence of staining of the corresponding cellular or tissue elements of the infiltrate around the catheter  
 – lack of staining of the corresponding cellular or tissue elements of the infiltrate around the catheter  
 ± intermediate result

а сами молекулы этих пептидов являются сильными хемотаксантами для гранулоцитов [19, 25].

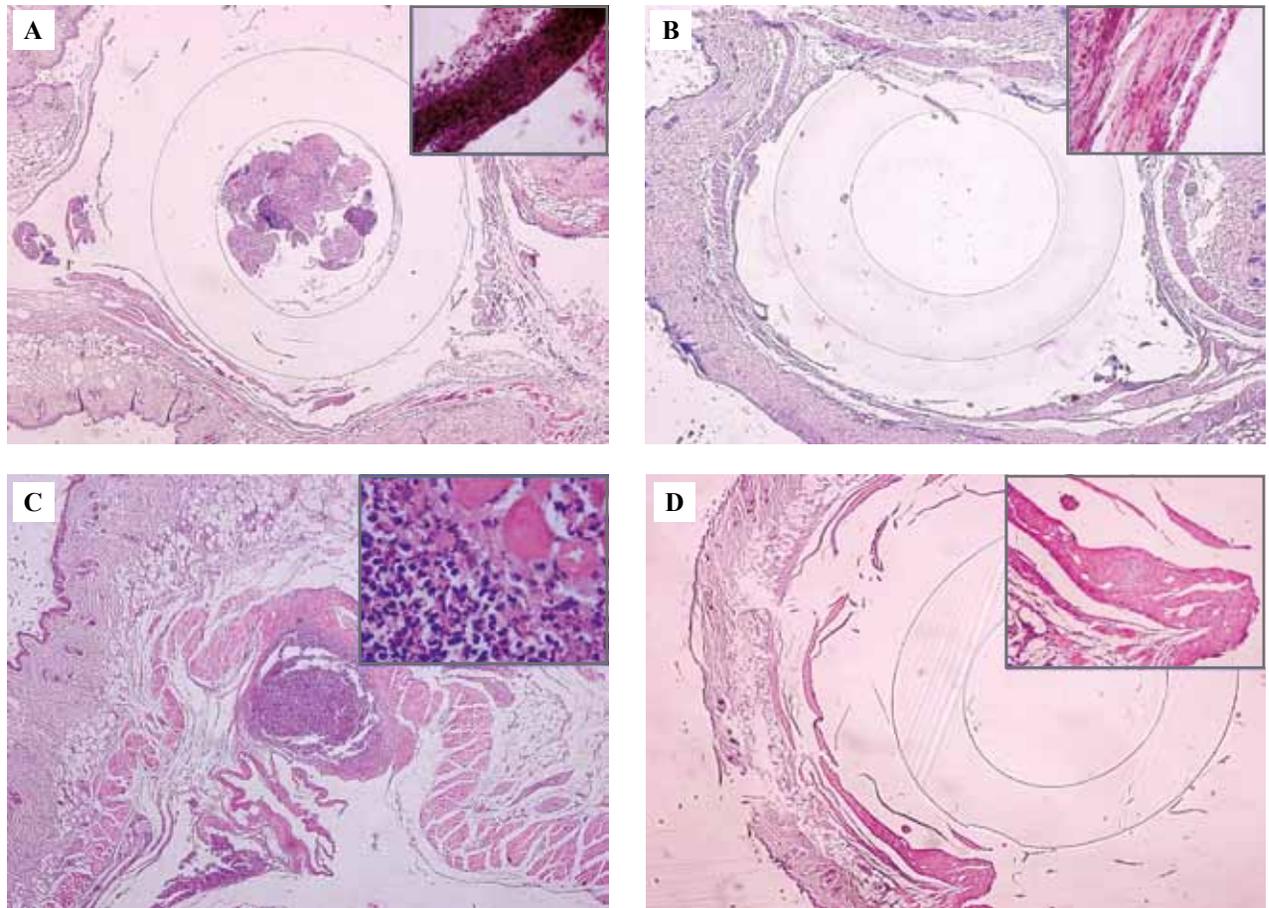
Исследованиями ряда авторов [8, 27] показано, что в составе биопленок микроорганизмов присутствуют вещества, блокирующие таксис и дифференцировку Т- и В- лимфоцитов. Возможно, что активное разрушение биопленок под действием варнерина на 3-и сутки приводит к высвобождению подобных соединений, способствующих удалению из окружающих отрезков катетера тканей дифференцированных форм лимфоцитов, что и наблюдалось на 3-и сутки в данной подгруппе.

Известно, что синтез и модификация виментина – важнейшего белка промежуточных филаментов соединительной ткани – во многом осуществляются с участием провоспалительных цитокинов. При этом высокая экспрессия виментина свидетельствует об активации процессов репарации и увеличении пула мезенхимальных клеточных элементов в очаге воспаления [28]. Показано, что развитие воспалительных процессов сопровождается повышением экспрессии адгезивных молекул эндотелиоцитами (CD34), что обеспечивает аккумуляцию лейкоцитов в микроциркуляторном русле зоны воспаления и их экстравазацию в ткань, а высокий уровень экспрессии CD34 свидетельствует об активации воспалительных и репаративных процессов

в тканях [29]. Важно отметить способность антибактериальных пептидов ингибировать синтез провоспалительных цитокинов [18, 30]. По-видимому, низкая экспрессия виментина, CD34 и, соответственно, слабая выраженность фибропластической реакции в инфильтратах могут быть обусловлены непосредственным действием варнерина.

С учетом способности разрушенных микроорганизмов стимулировать выработку цитокинов и пептидную природу вводимого варнерина можно предположить недостаточность ингибирующего действия варнерина при избытке провоспалительных цитокинов, что и наблюдается в данном случае в виде слабоположительной реакции на виментин. При этом в целом в данной подгруппе экспериментов отмечались достаточно выраженные эффекты антибактериального действия варнерина (рис. 4).

При ежесуточном введении взвесей стафилококков и варнерина в область имплантации отрезков стерильных катетеров (вторая подгруппа) рост числа микроорганизмов на 3-и сутки экспериментов становился минимальным (рис. 3), в воспалительном инфильтрате наблюдалось значительное количество нейтрофильных гранулоцитов ( $p=0,0472$ ) и относительно небольшое количество фибробластов, что отличало характеристики

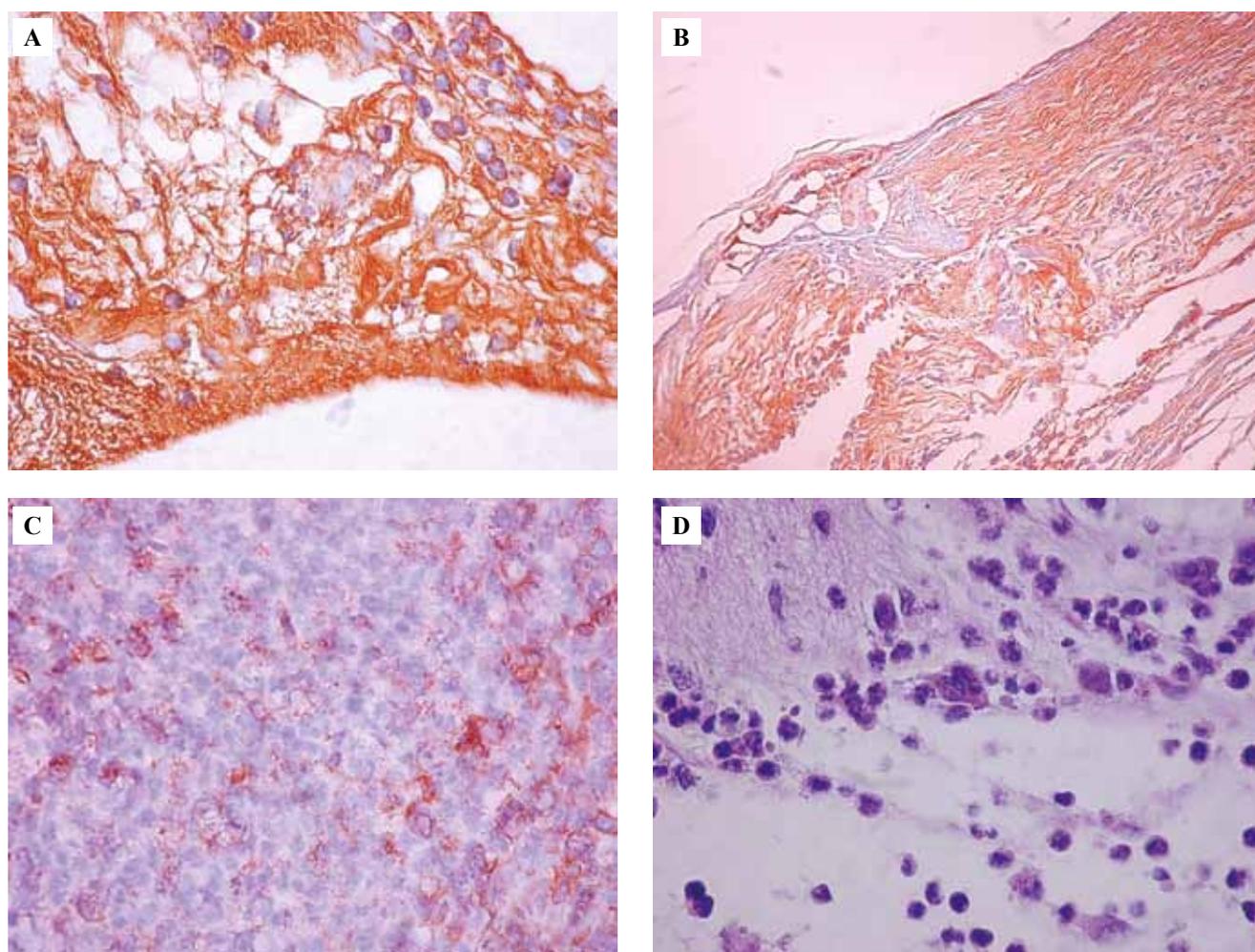


**Рис. 4.** Влияние варнерина на мягкие ткани вокруг отрезка катетера при моделировании катетер-ассоциированной инфекции. А – скопления микроорганизмов, воспалительный инфильтрат внутри и вокруг отрезка на 2-е сутки при имплантации катетера с биопленками и ежесуточном введении варнерина. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 10$ , окрашивание по Броун–Хоппсу,  $\times 100$ . В – отсутствие скоплений микроорганизмов внутри и вокруг отрезка на 3-и сутки при имплантации катетера с биопленками и ежесуточном введении варнерина. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 10$ , окрашивание по Броун–Хоппсу,  $\times 100$ . С – воспалительный инфильтрат на 2-е сутки при ежесуточном введении взвесей стафилококков в зону имплантации отрезка катетера и последующем ежесуточном введении в эту зону варнерина. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ ,  $\times 400$ . D – отсутствие воспалительного инфильтрата на 3-и сутки при ежесуточном введении взвесей стафилококков в зону имплантации отрезка катетера и последующем ежесуточном введении в ту же зону варнерина. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 40$ ,  $\times 100$

**Fig. 4.** Warnerin effect on soft tissues around a catheter segment in a catheter-associated infection model. A – accumulation of microorganisms, inflammatory infiltrate inside and around the segment on day 2 in animals with catheter implantation with biofilms and daily warnerin injection. H&E stain,  $\times 10$ , Brown-Hoppps stain,  $\times 100$ . B – no accumulations of microorganisms inside and around the segment on day 3 after the catheter implantation with biofilms and daily warnerin injection. H&E stain,  $\times 10$ , Brown-Hoppps stain,  $\times 100$ . C – inflammatory infiltrate on day 2 with the daily staphylococci suspension administration into the implantation zone of the catheter segment and the subsequent daily warnerin injection. H&E stain,  $\times 100$ ,  $\times 400$ . D – no inflammatory infiltrate on day 3 with the staphylococci suspension administration into the implantation zone of the catheter segment and subsequent daily warnerin injection. H&E stain,  $\times 40$ ,  $\times 100$

указанной подгруппы от характеристик аналогичной без применения варнерина (табл. 1). Иммуногистохимически в течение всех экспериментов выявлялись преимущественно Т-лимфоциты и отмечалась положительная реакция на виментин и CD34 (рис. 5). Данные изменения в виде уменьшения объема скоплений микроорганизмов, реакции нейтрофилов, тенденции к уменьшению количества фибробластов и стимуляции Т-клеточного ответа, возможно, тоже обусловле-

ны действием варнерина, даже с учетом достаточно интенсивного бактериального обсеменения. Следует отметить, что аналогичные результаты в виде увеличения количества нейтрофилов и уменьшения количества фибробластов, а также появления дифференцированных форм лимфоцитов в воспалительном инфильтрате вокруг отрезков катетеров были получены и описаны нами ранее при исследовании действия варнерина при имплантации стерильных катетеров [17].



*Рис. 5.* Воспалительный инфильтрат при ежесуточном введении взвесей стафилококков в зону имплантации отрезка катетера и последующем ежесуточном введении в эту зону варнерина.

А – положительная иммуногистохимическая реакция на CD34 в тканях, окружающих отрезок катетера. CD34 + ( $\times 1000$ ), 2-е сутки. В – положительная иммуногистохимическая реакция на виментин в тканях, окружающих отрезок катетера. Vimentin + ( $\times 400$ ), 2-е сутки. С – положительная иммуногистохимическая реакция на CD3 на мембране лимфоцитов в тканях, окружающих отрезок катетера. CD3 + ( $\times 1000$ ), 2-е сутки. D – воспалительный инфильтрат в мягких тканях вокруг катетера, представленный преимущественно нейтрофилами. Окраска гематоксилином и эозином ( $\times 1000$ ), 3-и сутки

*Fig. 5.* Inflammatory infiltrate with daily staphylococci suspension administration into the implantation zone of the catheter segment and subsequent daily warnerin injection.

A – positive immunohistochemical reaction for CD34 in the tissues surrounding the catheter segment. CD34 + ( $\times 1000$ ), day 2. B – positive immunohistochemical reaction for Vimentin in the tissues surrounding the catheter segment. Vimentin + ( $\times 400$ ), day 2. C – positive immunohistochemical reaction for CD3 on the lymphocyte membranes in the tissues surrounding the catheter segment. CD3 + ( $\times 1000$ ), 2 days. D – inflammatory infiltrate in the soft tissues surrounding the catheter, represented mainly by neutrophils. H&E stain ( $\times 1000$ ), day 3

Исходя из полученных данных, можно констатировать, что низкомолекулярный катионный пептид варнерин при местном применении обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении биопленок коагулазонегативных стафилококков. Введение варнерина ведет к уменьшению скоплений микроорганизмов как при моделировании КАИ путем имплантации отрезков катетеров со сформированными биопленками, так и при ежесуточном введении взвесей

стафилококков в область имплантации отрезков катетеров, хотя и в меньшей степени.

### Закключение

При моделировании катетер-ассоциированных инфекций морфологическая картина в мягких тканях лабораторных животных протекает как воспалительная реакция на инородное тело, при этом отмечается ряд особенностей в зависимости от характера инфициро-

вания отрезков катетеров. Бактериальная обсемененность имплантируемых отрезков катетеров, особенно при непосредственном введении взвесей стафилококков, приводит к значительной выраженности воспалительной реакции за счет развития гнойного воспаления. Подобные явления наблюдаются у пациентов с установленными катетерами при иммунодефицитных состояниях. Моделирование катетер-ассоциированных инфекций с применением варнерина – нового низкомолекулярного пептида семейства лантибиотиков ведет к исчезновению или резкому уменьшению скоплений микроорганизмов. При этом под действием самого варнерина как эффективного катионного антибактериального соединения в воспалительном инфильтрате увеличивается количество нейтрофилов и снижается количество фибробластов.

Таким образом, модель катетер-ассоциированной инфекции у мышей может быть использована для экспериментального изучения антибактериальной активности новых лекарственных препаратов, способных подавлять образование и функционирование биопленок коагулазонегативных стафилококков на имплантируемых изделиях из полимерных материалов.

#### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.Г. Фрейнд, В.П. Коробов.  
Сбор и обработка материала – В.В. Литвинов, Л.М. Лемкина.  
Написание текста – В.В. Литвинов.  
Редактирование – Г.Г. Фрейнд, В.П. Коробов.

#### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – G.G. Freynd, V.P. Korobov.  
Collected the data and performed the analysis – V.V. Litvinov, L.M. Lemkina.  
Wrote the paper – V.V. Litvinov.  
Edited the manuscript – G.G. Freynd, V.P. Korobov.

#### Литература/References

1. Pitiriga V, Kanellopoulos P, Bakalis I, Kampos E, Sagris I, Saroglou G et al. Central venous catheter-related bloodstream infection and colonization: The impact of insertion site and distribution of multidrug-resistant pathogens. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):189. DOI: 10.1186/s13756-020-00851-1.
2. Багирова Н.С. Инфекции, связанные с внутрисосудистыми устройствами: терминология, диагностика, профилактика и терапия. *Злокачественные опухоли*. 2014;(3):164–171. DOI: 10.18027/2224-5057-2014-3-164-171.  
Bagirova NS. Infections associated with intravascular devices: Terminology, diagnosis, prevention and therapy. *Malignant Tumours*. 2014;(3):164–171 (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2014-3-164-171.
3. Tianyi FL, Tochie JN, Danwang C, Mbonda A, Temgoua MN, Mapoh SY et al. Global epidemiology of septic shock: A protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2019;9:e032289. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-032289.
4. Hebeisen U, Babouee Flury B, Atkinson A, Marschall J, Buetti N. Catheter-related bloodstream infections due to coagulase-negative staphylococci managed with catheter removal: Recurrences are rare. *Am J Infect Control*. 2020;48(7):837–9. DOI: 10.1016/j.ajic.2019.10.013.
5. Квашнина Д.В., Ковалишена О.В., Белянина Н.А. Комплексная клинико-этиологическая и эпидемиологическая характеристика катетер-ассоциированных инфекций кровотока. *Медицинский альманах*. 2017;49(4):41–45. DOI: 10.21145/2499-9954-2017-4-41-45.  
Kvashnina D, Kovalishena O, Belyanina N. Comprehensive clinical and etiological, as well as epidemiological characteristics of the catheter-associated blood circulation infections. *Medical Almanac*. 2017;49(4):41–45 (In Russ.). DOI: 10.21145/2499-9954-2017-4-41-45.
6. Safdar N, Fine JP, Maki DG. Meta-analysis: Methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. *Ann Intern Med*. 2005;142(6):451–66. DOI: 10.7326/0003-4819-142-6-200503150-00011.
7. Mermel LA. What is the predominant source of intravascular catheter infections? *Clin Infect Dis*. 2010;52(2):211–2. DOI: 10.1093/cid/ciq108.
8. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563–75. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
9. O'Toole GA. To build a biofilm. *J Bacteriol*. 2003;185(9):2687–9. DOI: 10.1128/jb.185.9.2687-2689.2003.
10. Knezevic V. Complications catheter-related infections in patients on hemodialysis (septic infections of patients on hemodialysis). *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy*. 2017;39(5–6):87–92. DOI: 10.5937/sjait1704087k.
11. Ferreira J, Camargos PAM, Rosado V, Mourão PHO, Romanelli RMC. Risk factors for central venous catheter-related bloodstream infection in neonates. *Am J Infect Control*. 2020;48(9):1102–3. DOI: 10.1016/j.ajic.2019.12.004.
12. Hsu JF, Tsai MH, Huang HR, Lien R, Chu SM, Huang CB. Risk Factors of catheter-related bloodstream infection with percutaneously inserted central venous catheters in very low birth weight infants: A center's experience in Taiwan. *Pediatr Neonatol*. 2010;51(6):336–42. DOI: 10.1016/s1875-9572(10)60065-4.
13. Chung JW, Greenwood-Quaintance KE, Karau MJ, Tilahun A, Khaleghi SR, Chowdhary VR et al. Superantigens produced by catheter-associated *Staphylococcus aureus* elicit systemic inflammatory disease in the absence of bacteremia. *J Leukoc Biol*. 2015;98(2):271–81. DOI: 10.1189/jlb.4a1214-577rr.
14. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun*. 1999;67(5):2627–32. DOI: 10.1128/iai.67.5.2627-2632.1999.
15. Arunachalam K, Ramar M, Ramanathan S, Govindaraju A, Shunmugiah KP, Kandasamy R et al. In vivo protective effect of geraniol on colonization of *Staphylococcus epidermidis* in rat jugular vein catheter model. *Pathog Dis*. 2018;76(5). DOI: 10.1093/femspd/fty055.
16. Basas J, Palau M, Rattia C, Del Pozo JL, Martín-Gómez MT, Gomis X et al. High-dose daptomycin is effective as an antibiotic

- lock therapy in a rabbit model of Staphylococcus epidermidis catheter-related infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(2): e01777-17. DOI: 10.1128/AAC.01777-17.
17. Litvinov VV, Lemkina LM, Freund GG, Korobov VP. Morphological characteristics of the action of cationic peptide warnerin on regeneration of the connective tissue around implanted teflon catheters in mice under conditions of immunosuppression. *Bull Exp Biol Med.* 2020;169(4):521–4. DOI: 10.1007/s10517-020-04922-6.
  18. Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Antimicrobial host defence peptides: Functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):311–32. DOI: 10.1038/s41573-019-0058-8.
  19. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes S, Terán L. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 2010;135(1):1–11. DOI: 10.1016/j.clim.2009.12.004.
  20. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science.* 2020;368(6490):eaau5480. DOI: 10.1126/science.aau5480.
  21. Hancock RE. Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(3):156–64. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00092-5.
  22. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016;9(3):59. DOI: 10.3390/ph9030059.
  23. Sandiford S, Upton M. Identification, characterization, and recombinant expression of epidermicin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by Staphylococcus epidermidis that displays potent activity against Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1539–47. DOI: 10.1128/aac.05397-11.
  24. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun.* 2008;76(9):4176–82. DOI: 10.1128/iai.00318-08.
  25. Muttenthaler M, King GF, Adams DJ, Alewood PF. Trends in peptide drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(4):309–25. DOI: 10.1038/s41573-020-00135-8.
  26. Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017;53(1):47–54. DOI: 10.7868/S0555109917010147. Polyudova TV, Lemkina LM, Likhatskaya GN, Korobov VP. Optimization of production conditions and 3D-structure modeling of novel antibacterial peptide of lantibiotic family. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2017;53(1):47–54 (In Russ.). DOI: 10.7868/S0555109917010147.
  27. de la Fuente-Núñez C, Mertens J, Smit J, Hancock RE. The bacterial surface layer provides protection against antimicrobial peptides. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(15):5452–6. DOI: 10.1128/aem.01493-12.
  28. Homan SM, Martinez R, Benware A, La Flamme SE. Regulation of the association of alpha 6 beta 4 with vimentin intermediate filaments in endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2002;281(1):107–14. DOI: 10.1016/s0014-4827(02)95643-0.
  29. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996;87(1):1–13. DOI: 10.1182/blood.V87.1.1.1.
  30. Miller SI. Antibiotic resistance and regulation of the Gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. *mBio.* 2016;7(5). DOI: 10.1128/mbio.01541-16.

### Информация об авторах

Валерий Викторович Литвинов – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера.

Лариса Марковна Лемкина – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Генриетта Герхардовна Фрейн – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии с секционным курсом Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера.

Владимир Павлович Коробов – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

### Author information

Valeriy V. Litvinov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-0300-4424>

Larisa M. Lemkina – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Microorganisms Biochemical Development, Research Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms. <https://orcid.org/0000-0002-2562-5344>

Genrietta G. Freynd – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2861-4878>

Vladimir P. Korobov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Laboratory of Microorganisms Biochemical Development, Research Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms. <https://orcid.org/0000-0003-3475-8285>