

<https://doi.org/10.29296/25877305-2022-03-09>

Антибактериальные свойства хемокина CXCL9

А.З. Биджиев¹,Л.А. Краева^{1,2}, доктор медицинских наук,О.А. Бургасова^{3,4}, доктор медицинских наук¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург³Российский университет дружбы народов, Москва⁴Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

E-mail: olgaburgasova@mail.ru

В последние годы наблюдается небывалый рост резистентности штаммов бактерий к антибактериальным препаратам. В мире регистрируются миллионы смертей в год, связанные с распространением антибиотикорезистентных штаммов. Однако в организме человека существует малоизученная естественная система противодействия микроорганизмам – хемокины. Цель работы – исследование антибактериальных свойств хемокина CXCL9. В результате проведенного исследования выявлено антибактериальное действие хемокина CXCL9 по отношению к клинически значимым видам бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*). Бактерицидный устойчивый эффект в отношении бактерий *Listeria monocytogenes* отмечен в течение 7 ч после контакта с хемокином CXCL9. Полученные результаты продемонстрировали наличие антибактериальных свойств у хемокина CXCL9 по отношению к целому ряду микроорганизмов с различным строением клеточной стенки.

Ключевые слова: хемокин CXCL9, антибактериальная активность, антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Биджиев А.З., Краева Л.А., Бургасова О.А. Антибактериальные свойства хемокина CXCL9. Врач. 2022; 33 (3): 47–50. <https://doi.org/10.29296/25877305-2022-03-09>

Проблема появления и распространения полирезистентных штаммов патогенных бактерий создает серьезный вызов современной системе здравоохранения во всем мире. Основными причинами появления резистентных штаммов являются частые случаи самолечения, генетические мутации в бактериях и фенотипические вариации. Появление таких штаммов ведет к увеличению количества летальных случаев среди больных [1]. Поиск новых антибактериальных препаратов (АБП) представляется одним из главных путей, которые могли бы помочь преодолеть эту проблему. Однако несмотря на все усилия, скорость разработки новых эффективных АБП демонстрирует заметное снижение своих темпов в по-

следние десятилетия и проигрывает в этом противостоянии постоянному появлению новых устойчивых штаммов.

Хемокины являются представителями одного из самых больших подсемейств, насчитывающих около 50 структурно гомологичных протеинов [2]. Основываясь на количестве и расположении консервативных цистеинов, хемокины разделены на 4 группы:

- СХС;
- СС;
- ХС;
- СХЗС [3].

Хотя способность хемокинов регулировать клеточное движение является центральным для большого количества биологических процессов в норме и при патологии, они не действуют только лишь как факторы хемотаксиса. Показано, что хемокины участвуют во многих важных биологических процессах, таких как гематопоз, ангиогенез, агниостазис, развитие онкологии и защита организма против микробных инфекций [4–6]. В частности, показана важная роль хемокинов CXCL9, CXCL10, CXCL11 в способности организма противостоять инфекциям, обусловленным бактериями *Bacillus anthracis* [7], *Streptococcus pyogenes* [8], *Chlamydomphila pneumoniae* [9], а также показали эффективность против клинически значимых полирезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* [10]. Различные представители хемокинов всех 4 групп (СХС, СС, ХС, СХЗС) показали антибактериальную способность по отношению к широкому спектру патогенных микроорганизмов из группы грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* и др.) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.) бактерий, паразитов (*Leishmania mexicana*) и грибов (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) [11–13].

В настоящей работе предпринята попытка продемонстрировать антибактериальные свойства хемокина CXCL9. Для этого проведен скрининг антибактериальных свойств хемокина CXCL9 относительно ряда клинически значимых микроорганизмов, а также оценены условия проявления этих свойств.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Реагенты. В работе использованы рекомбинантные человеческие хемокины CXCL9 (Biolegend, Inc., San Diego, США). Для разведения аликвотных растворов использовали стерильный 0,1М фосфатный буфер рН 7,5. В работе использовали жидкие и твердые питательные среды для выращивания микроорганизмов (Biovitrum, Россия).

Бактериальные культуры и условия роста. В настоящей работе использованы бактериальные культуры некоторых видов из следующих микроорганизмов родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*,

Neisseria, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria* и *Candida*. Использовали культуры, полученные как из клинических образцов, так и референтные штаммы. Бактерии культивировали на среде Мюллера–Хинтона и на кровяном агаре. Все штаммы выращивали в термостате при 37°C. Мясопептонный бульон был использован в экспериментах при культивировании для всех микроорганизмов.

Исследование антимикробных свойств. Метод скрининга антибактериальной активности. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне 24 ч при 37°C. Для стандартизации суточной бактериальной культуры применяли измерение стандартной мутности, равное 0,5 по МакФарланду, что соответствовало $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Далее методом 10-кратных серийных разведений культуру доводили до концентрации $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Последняя использовалась для посева на чашки Петри с твердой питательной средой, куда раскапывали по 5 мкл хемокина в концентрации 15,5 мкМ. Чашки инкубировали в термостате 24 ч при 37°C. По истечении этого срока чашки проверяли на антибактериальное действие хемокина.

Метод подсчета колониеобразующих единиц. Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне 24 ч при 37°C. Для стандартизации суточной бактериальной культуры также применяли измерение стандартной мутности, равное 0,5 по МакФарланду, что соот-

ветствовало $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, и дальнейшие 10-кратные серийные разведения до достижения нужной бактериальной концентрации $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В конечном экспериментальном образце 50 мкл бактериальной суспензии раскапывали по U-образным лункам 96-луночного планшета. В экспериментальных лунках концентрация хемокина соответствовала 1,55 мкМ, в контрольные лунки добавляли стерильный 0,1 М фосфатный буфер pH 7,5. Смеси инкубировали при 37°C. На 1-й, 2-й, 3-й, 5-й и 6-й часы после инкубирования суспензий клеток образцы доставали из термостата и высевали на чашки с твердой питательной средой по 2 мкл методом «газонного» посева. Инокулированные чашки помещали в термостат на 24 ч при 37°C, после чего производили подсчет колоний в каждой чашке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хемокин CXCL9 показал широкую антибактериальную активность в отношении как грамположительных (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria*), так и грамотрицательных (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*) бактерий, а также в отношении грибов (*Candida*). Эти данные согласуются с результатами предыдущих работ, где также показано, что хемокины проявляют антибактериальные эффекты против широкого спектра микроорганизмов [8, 11, 12, 14, 15]. Интересным представляются полученные данные относительно бактерий рода *Streptococcus*. Как видно из таблицы, антибактериальные эффекты различались в зависимости от вида бактерий. Это позволяет предположить наличие механизмов подавления антибактериальной активности хемокина CXCL9 у разных представителей. Данные, продемонстрированные А. Егестен и соавт., согласуются с результатами, полученными в настоящем исследовании. Показана важная роль хемокина CXCL9 в защите организма при инфекции *Streptococcus pyogenes* и способность хемокина проявлять бактерицидные свойства в отношении этого микроорганизма. Однако некоторые серотипы проявляли способность ингибировать антимикробные свойства хемокина CXCL9 с помощью специфичных протеинов [8]. Можно предположить, что подобные взаимодействия имели место при исследовании антибактериальных свойств хемокина CXCL9 по отношению к различным штаммам бактерий рода *Streptococcus* (см. таблицу).

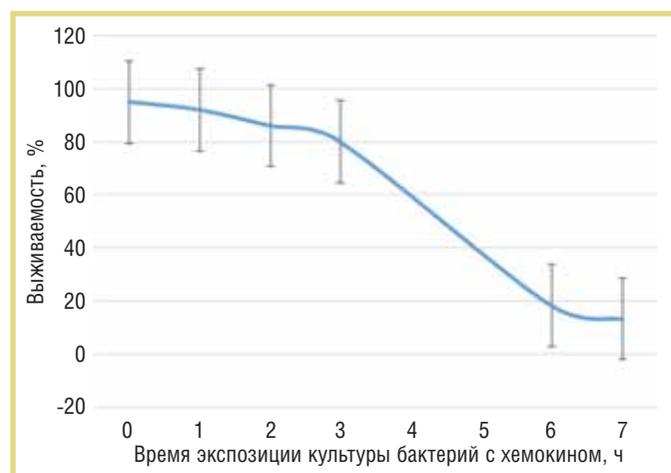
Также изучена зависимость антибактериальной активности хемокина CXCL9 в отношении культуры *Listeria monocytogenes*

Результаты скрининга антибактериальной активности хемокина CXCL9 *in vitro* на плотной питательной среде
Results of *in vitro* screening of the antibacterial activity of the chemokine CXCL9 on solid nutrient medium

Тип строения клеточной стенки микроорганизма	Наименование микроорганизма	Бактерицидное действие
Грамотрицательные микроорганизмы	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35211	+
	<i>Escherichia coli</i> №947	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №511	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №3576	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i> №3566	–
	<i>Neisseria flavescens</i> №741	–
Грамположительные микроорганизмы	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25913	–
	<i>Staphylococcus aureus</i> №352	+
	<i>Streptococcus agalactiae</i> №509	+
	<i>Streptococcus pyogenes</i> №1856	–
	<i>Streptococcus pyogenes</i> №1101	–
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> №6844	–
	<i>Enterococcus faecalis</i> №1242	+
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ATCC 10648	+
	<i>Listeria monocytogenes</i> №52912	+
	<i>Candida albicans</i> №925	+

от времени совместной экспозиции. Для определения антибактериальной активности хемокина CXCL9 в отношении культуры бактерий *Listeria monocytogenes* применен метод подсчета колониеобразующих единиц. Выживаемость бактерий определялась отношением количества колоний в экспериментальной лунке к количеству колоний в контрольной лунке (без хемокина). Зависимость времени экспозиции хемокина CXCL9 с бактериальной культурой клеток *Listeria monocytogenes* 52912 продемонстрирована на рисунке.

Концентрация солей в наших экспериментальных средах при культивировании микроорганизмов и определении антимикробных свойств хемокина была на физиологическом уровне, что составляет приблизительно 150 мМ. В исследовании [15] антибактериальных свойств различных хемокинов показана зависимость антибактериальной активности последних от концентрации соли – чем выше была концентрация, тем меньше проявлялась антибактериальная активность. Такая же зависимость показана для хемокина CXCL9 [14]. С другой стороны, в некоторых работах показано отсутствие влияния концентрации солей на антимикробную активность хемокина CXCL9 [8]. Полученные нами данные показывают скорее слабое или умеренное влияние концентрации соли на антибактериальную активность хемокина CXCL9. На наш взгляд, вопрос, касающийся возможного влияния концентрации соли на антибактериальную активность хемокина CXCL9, пока остается открытым. Неопределенности в этот аспект добавляет крайне скудное количество исследований в этом отношении. Как видно из рисунка, в первые 2–3 ч разница между количеством выживших клеток в лунке с хемокином и в лунке без добавления хемокина медленно увеличивается с течением времени и заметно



Антибактериальное действие хемокина CXCL9 по отношению к *Listeria monocytogenes*
Antibacterial activity of the chemokine CXCL9 against *Listeria monocytogenes*

усиливается после 3-го часа, таким образом демонстрируя сохраняющуюся антибактериальную активность хемокина в суспензии с начала эксперимента и до последнего измерения на 7-часовой отметке. Измерения антибактериальной активности хемокинов в работах большинства групп ученых в основном приходились на первые 2 ч после добавления хемокина в культуру клеток [10, 15–19]. Возможно, эффект снижения антибактериальной активности хемокина на фоне повышения концентрации солей проявляется в первые часы экспозиции. Еще одной причиной такой картины может быть влияние повышенной концентрации соли не на действие хемокина, а на бактериальные клетки, либо из-за изменения их метаболизма при использовании различных сред для выращивания в разных экспериментах. Эти вопросы требуют дальнейших исследований в отношении антибактериальных свойств хемокинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы выявлено антибактериальное действие хемокина CXCL9 по отношению к представителям микроорганизмов различных видов и родов с разным типом строения клеточной стенки. Наибольший оптимизм внушают результаты подавления роста таких клинически значимых бактерий, как *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*. Немаловажно, что все исследованные штаммы *Escherichia coli* были подвержены антибактериальному действию хемокина CXCL9. Исследование процесса в динамике показало, что подавление роста бактерий *Listeria monocytogenes* наблюдалось в течение 7 ч после контакта с хемокином. Полученные результаты продемонстрировали наличие антибактериальных свойств у хемокина CXCL9 по отношению к целому ряду микроорганизмов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование не имело финансовой поддержки.

Литература/References

1. Naveed M., Chaudhry Z., Bukhari S. A. et al. Antibiotics resistance mechanism. In: Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment. Elsevier, 2020; p. 292–312.
2. Zlotnik A. Perspective: Insights on the Nomenclature of Cytokines and Chemokines. *Front Immunol.* 2020; 11: 908. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00908
3. Murphy P.M., Baggiolini M., Charo I.F. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52 (1): 145–76.
4. Chensue S.W. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14 (4): 821–35. DOI: 10.1128/CMR.14.4.821-835.2001
5. Mehrad B., Keane M.P., Strieter R.M. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2007; 97 (5): 755–62.
6. Raman D., Baugher P.J., Thu Y.M. et al. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett.* 2007; 256 (2): 137–65. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.05.013
7. Crawford M.A., Burdick M.D., Glomski I.J. et al. Interferon-inducible CXCL chemokines directly contribute to host defense against inhalational anthrax in a murine model of infection. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (11): e1001199. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001199

8. Egesten A., Eliasson M., Johansson H.M. et al. The CXC chemokine MIG/CXCL9 is important in innate immunity against *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis.* 2007; 195 (5): 684–93. DOI: 10.1086/510857
9. Balogh E.P., Faludi I., Virók D.P. et al. Chlamydomydia pneumoniae induces production of the defensin-like MIG/CXCL9, which has in vitro antichlamydial activity. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301 (3): 252–9. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.08.020
10. Crawford M.A., Fisher D.J., Leung L.M. et al. CXC Chemokines Exhibit Bactericidal Activity against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *mBio.* 2017; 8 (6): e01549-17. DOI: 10.1128/mBio.01549-17
11. Yung S.C., Murphy P.M. Antimicrobial chemokines. *Front Immunol.* 2012; 3: 276. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00276
12. Crawford M.A., Margulieux K.R., Singh A. et al. Mechanistic insights and therapeutic opportunities of antimicrobial chemokines. *Semin Cell Dev Biol.* 2019; 88: 119–28. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.02.003
13. Söbirk S.K., Mörgelin M., Egesten A. et al. Human chemokines as antimicrobial peptides with direct parasitocidal effect on *Leishmania mexicana* in vitro. *PLoS One.* 2013; 8 (3): e58129. DOI: 10.1371/journal.pone.0058129
14. Cole A.M., Ganz T., Liese A.M. et al. Cutting edge: IFN-inducible ELR-CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol.* 2001; 167 (2): 623–7. DOI: 10.4049/jimmunol.167.2.623
15. Yang D., Chen Q., Hoover D.M. et al. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol.* 2003; 74 (3): 448–55. DOI: 10.1189/jlb.0103024
16. Frick I.M., Nordin S.L., Baumgarten M. et al. Constitutive and inflammation-dependent antimicrobial peptides produced by epithelium are differentially processed and inactivated by the commensal *Fingoldia magna* and the pathogen *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol.* 2011; 187 (8): 4300–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1004179
17. Burkhardt A.M., Tai K.P., Flores-Guiterrez J.P. et al. CXCL17 is a mucosal chemokine elevated in idiopathic pulmonary fibrosis that exhibits broad antimicrobial activity. *J Immunol.* 2012; 188 (12): 6399–406. DOI: 10.4049/jimmunol.1102903
18. Linge H.M., Collin M., Nordenfelt P. et al. The human CXC chemokine granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2)/CXCL6 possesses membrane-disrupting properties and is antibacterial. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (7): 2599–607. DOI: 10.1128/AAC.00028-08
19. Kotarsky K., Sitnik K.M., Stenstad H. et al. A novel role for constitutively expressed epithelial-derived chemokines as antibacterial peptides in the intestinal mucosa. *Mucosal Immunol.* 2010; 3 (1): 40–8. DOI: 10.1038/mi.2009.115

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF THE CHEMOKINE CXCL9

A. Bidzhiev¹; L. Kraeva^{1,2}, MD; O. Burgasova^{3,4}, MD

¹Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg

²S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg

³Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

⁴N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

*In recent years, there has been an unprecedented increase in the resistance of bacterial strains to antibiotics. Millions of deaths per year are recorded worldwide due to the spread of antibiotic-resistant strains. However, in the human body there is a little-studied natural system of counteracting microorganisms - chemokines. To investigate the antibacterial properties of the chemokine CXCL9. The conducted study revealed the antibacterial effect of the CXCL9 chemokine on clinically significant bacterial species (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium diphtheriae*, and *Listeria monocytogenes*). A bactericidal stable activity against the bacteria *Listeria monocytogenes* was noted within 7 hours after contact with the chemokine CXCL9. The findings demonstrated the presence of antibacterial properties of the chemokine CXCL9 in relation to a number of microorganisms with the different structure of the cell wall.*

Key words: the chemokine CXCL9, antibacterial activity, antibiotic resistance.

For citation: Bidzhiev A., Kraeva L., Burgasova O. Antibacterial properties of the chemokine CXCL9. *Vrach.* 2022; 33 (3): 47–50. <https://doi.org/10.29296/25877305-2022-03-09>