https://doi.org/10.17116/molgen2023410413

Цитотоксическая активность феназиновых соединений *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* в отношении культуры клеток HeLa

© А.А. ЖИЗНЕВСКАЯ, А.А. ЛУКАШЕВИЧ, Н.П. МАКСИМОВА, Е.Г. ВЕРЕМЕЕНКО

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

РЕЗЮМЕ

Исследована цитотоксическая активность феназиновых соединений различных штаммов бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* в отношении линии клеток аденокарциномы шейки матки HeLa. Установлено, что цитотоксические концентрации феназинов в отношении клеток линии HeLa составляют 300 мкг/мл. Получены цитологические препараты клеток HeLa после обработки феназинами, которые демонстрируют наличие апоптотических телец. Показано, что действие феназинов на клетки линии HeLa приводит к изменению экспрессии в них генов ABC-транспортеров (*abcc1* и *abcg2*) и *tp53*. Активность последнего увеличивается почти в 13 раз, тогда как экспрессия генов *abcc1* и *abcg2* снижается. Активация *tp53*, вероятно, является одной из причин апоптотической гибели клеток линии HeLa в присутствии феназиновых соединений бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Ключевые слова: *феназины, цитотоксическая активность, HeLa, апоптоз, ABC-транспортеры.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Жизневская А.А. — https://orcid.org/0009-0003-5625-9812; e-mail: anastasia.zhyzneyskaya@gmail.com
Лукашевич А.А. — e-mail: lukashevichalesya@gmail.com
Максимова Н.П. — e-mail: nataliamaximova@yahoo.com
Веремеенко Е.Г. — e-mail: veremeenkokatya@yandex.ru
Автор, ответственный за переписку: Жизневская А.А. — e-mail: anastasia.zhyzneyskaya@gmail.com

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Жизневская А.А., Лукашевич А.А., Максимова Н.П., Веремеенко Е.Г. Цитотоксическая активность феназиновых соединений *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* в отношении культуры клеток HeLa. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2023;41(4):3–9. https://doi.org/10.17116/molgen2023410413

Cytotoxic activity of phenazine compounds *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* in relation to HeLa cell culture

© A.A. ZHYZNEYSKAYA, A.A. LUKASHEVICH, N.P. MAKSIMOVA, E.G. VEREMEENKO

Belarusian State University, Minsk, Respublic of Belarus

ABSTRACT

In this work, the cytotoxic activity of phenazine compounds of different strains of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* against the cervical adenocarcinoma cell line HeLa was investigated. The cytotoxic concentrations of phenazines against HeLa cells were 300 mcg/ml. Cytological preparations of HeLa cells were obtained after incubation with phenazines, showing the presence of apoptotic bodies. It was shown that the effect of phenazines on HeLa cells leads to a change in the expression of their ABC transporter genes (*abcc1* and *abcg2*) and of *tp53*. The activity of *tp53* increases almost 13-fold, while the expression of the *abcc1* and *abcg2* genes decreases. Activation of *tp53* is probably one of the causes of apoptotic death of HeLa cells in the presence of phenazine compounds from *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Keywords: *Phenazines, cytotoxic activity, HeLa, apoptotic death, ABC transporter.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Zhyzneyskaya A.A. — https://orcid.org/0009-0003-5625-9812; e-mail: anastasia.zhyzneyskaya@gmail.com
Lukashevich A.A. — e-mail: lukashevichalesya@gmail.com
Maksimova N.P. — e-mail: nataliamaximova@yahoo.com
Veremeenko E.G. — e-mail: veremeenkokatya@yandex.ru
Corresponding author: Zhyzneyskaya A.A. — e-mail: anastasia.zhyzneyskaya@gmail.com

TO CITE THIS ARTICLE:
Zhyzneyskaya AA, Lukashevich AA, Maksimova NP, Veremeenko EG. Cytotoxic activity of phenazine compounds *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* in relation to HeLa cell culture. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2023;41(4):3–9. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/molgen2023410413

Введение

Вторичные метаболиты ряда микроорганизмов обладают выраженной биологической активностью, которая придает конкурентное преимущество их продуцентам. Многие из веществ микробного происхождения демонстрируют ценные для человека качества, такие как антибиотические и цитотоксические свойства. Такие соединения активно изучаются с целью их дальнейшего применения в качестве лекарственных препаратов.

Одной из основных проблем современной медицины являются онкологические заболевания. Высокая смертность пациентов обусловлена быстрым прогрессированием опухолей, низкой эффективностью препаратов наряду с их токсичностью в отношении нормальных клеток организма. Появление рецидивов заболевания связано в том числе с развитием лекарственной резистентности. В связи с этим по-прежнему актуальным является поиск и разработка новых высокоэффективных противоопухолевых препаратов.

Получение биологически активных молекул из таких природных источников, как микроорганизмы, позволяет существенно расширить спектр тестируемых соединений. Большой интерес в этом отношении вызывают ароматические гетероциклические соединения. Одной из групп таких веществ являются феназины. Они представляют собой вторичные метаболиты почвенных и глубоководных морских микроорганизмов родов *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Sorangium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Xanthomonas* и др. [1]. Показано также наличие связанного с мембраной и используемого в качестве переносчика электронов в процессе метаногенеза производного феназина у архей рода *Methanosarcina* [2]. Для исследовательских и промышленных целей феназины чаще всего получают из грамположительных бактерий рода *Streptomyces* и грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas*. Представители данных родов обладают наиболее высоким природным уровнем синтеза этих метаболитов и широким разнообразием их природных производных, что делает их более перспективными кандидатами на роль продуцентов феназиновых соединений [3].

Основу химической структуры феназинов составляет пиразиновое кольцо (1,4-диазабензол), которое представляет собой группировку из двух бензольных колец, соединенных с помощью двух атомов азота. К ядру могут присоединяться разнообразные заместители, что обусловливает многообразие феназиновых производных и их биологических активностей [1, 4].

Так, феназины демонстрируют антибиотические, цитотоксические, противогрибковые, инсектицидные и противопаразитарные эффекты [3. 4]. К примеру, феназин-1-карбоновая кислота (ФКК), 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота и феназин-1-карбоксамид (ФКМ), продуцируемые бактериями родов *Pseudomonas fluorescens* и *P. chlororaphis*, выделяются в ризосферу, где ингибируют развитие почвенных фитопатогенных грибов [5]. ФКК, также известная как тубермицин В, обладает антибиотической активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis* [3]. Тубермицин В и хлорорафин (зеленый пигмент *P. aeruginosa*) эффективно ингибируют рост *Bacillus cereus*, вызывающей пищевые токсикоинфекции человека [3]. Феназиномицин проявляет как противоопухолевую, так и антибактериальную активность: показано, что он подавляет жизнедеятельность золотистого стафилококка, кроме того, он оказался эффективен в отношении саркомы у мышей *in vivo*. Для производного феназина, называемого NC-190, продемонстрирована противоопухолевая активность в отношении клеточной линии лейкемии человека HL-60, которая сопоставима с применяемым в клинической терапии этопозидом [6]. Также известно, что феназиномицин и лавандоцианин, выделенные из штаммов *Streptomyces* sp. CL190 и CL9659, проявляют ярко выраженную цитотоксическую активность в отношении андромицинустойчивой лейкозной клеточной линии P388 мышей и других опухолей грызунов *in vivo* [5]. ФКК и феназин-1,6-дикарбоновая кислота (ФДК) обладают цитотоксической активностью в отношении клеточных линий HeLa (карцинома шейки матки), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), DU145 (рак простаты) и HT29 (аденокарцинома толстого кишечника) [7]. ФКК и некоторые феназиновые производные ингибируют рост клеток меланомы линий SK-MEL-2 и B-16 [8, 9]. Исследована цитотоксичность пиоцианина в отношении клеток глиомы: при концентрации 200 мкг/мл гибель клеток этой культуры составляет 66,34% [10]. Противоопухолевые свойства феназиновых соединений как альтернативы современным медицинским препаратам активно исследуются зарубежными учеными в таких странах, как Китай, Япония, США, Великобритания [8, 11, 12]. Работы в этом направлении ведутся также в Республике Беларусь, на кафедре генетики биологического факультета Белорусского государственного университета [13].

Механизмы действия феназинов довольно разнообразны и зависят от химической структуры конкретного производного. Однако основным из них, присущим большинству изученных в этом отношении феназинов, является образование активных форм кислорода (АФК) [2]. За счет образования свободных радикалов феназины вызывают окислительный стресс в клетке, что ведет к ее гибели. Влияние активных форм кислорода наиболее выражено в отношении метаболически активных и интенсивно делящихся клеток, что характерно для большинства клеток опухолей. Кроме того, были идентифицированы производные феназина, которые блокируют действие топоизомераз I и II в эукариотических клетках. По-

скольку эти ферменты наиболее активны в клетке во время деления, их ингибирование особенно влияет на интенсивно пролиферирующие опухолевые клетки [1, 14]. Исследование противоопухолевой активности ФКМ продемонстрировало, что преобладающим типом гибели опухолевых клеток, по-видимому, является апоптоз. Это подтверждалось снижением мембранного потенциала митохондрий, повышенной экспрессией Bax, ингибированием антиапоптотических белков Bcl2-семейства, выходом цитохрома С и индукцией каспазы-3 [15]. Все вышесказанное демонстрирует перспективность исследования феназиновых соединений бактериального происхождения как потенциальной субстанции для получения новых противоопухолевых препаратов.

Цель исследования — анализ цитотоксической активности феназиновых соединений, продуцируемых штаммами бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca,* в отношении культуры клеток HeLa и выяснение цитологических и молекулярно-генетических механизмов действия данных соединений.

Материал и методы

В работе были использованы бактерии *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* штаммов B-162 (дикий тип), а также B-162/255, B-162/15, B-162/55, B-162/2, B-162/17 и B-162/18 (мутантные штаммы) из коллекции кафедры генетики Белорусского государственного университета [16]. В качестве объекта для исследования цитотоксического эффекта феназинов была использована культура клеток линии HeLa (перевиваемая культура аденокарциномы шейки матки человека) из коллекции ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии НАН Республики Беларусь».

Культивирование бактерий осуществляли в предложенной питательной среде для продукции антибиотиков ПСА [17] согласно стандартным протоколам [18]. Выделение и очистку феназиновых соединений проводили путем твердофазной экстракции по методике, предложенной в [19], на колонках фирмы Agilent SampliQ C18 (США), наполненных фенилсиликагелем Agilent (США). Высушивание препаратов осуществляли в роторном вакуумном концентраторе (Martin Christ, Германия). Полученные образцы феназиновых комплексов хранили при температуре −20°C. Определение концентрации феназинов проводили путем спектрофотометрирования при длине волны 369 нм [20] на приборе Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies (США).

Клетки линии HeLa культивировали в CO_2-инкубаторе Binder (Германия) (5% CO_2, 37°C) на вентилируемых стерильных матрасиках объемом 25 мл фирмы Corning (США) в питательной среде DMEM с L-глутамином Lonza (США) с содержанием бычьей фетальной сыворотки (10%) Capricorn scientific (Германия) и смеси антибиотиков и антимикотиков (10 мкг/мл) Capricorn scientific (Германия). Пересев культур производили при достижении ими плотности 10^6 кл/мл в стерильных условиях в ламинар-боксе HERA Safe, Heraeus (Германия) согласно протоколу [21].

Изучение цитотоксической активности феназинов проводили с использованием МТТ-теста согласно протоколу [22, 23]. Приготовление цитологических препаратов культур клеток HeLa происходило с использованием водно-солевого раствора акридинового оранжевого согласно [24].

Анализ изменения уровня экспрессии генов проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Выделение тотальной РНК осуществляли реагентом ExtractRNA компании «Евроген» (Россия) согласно инструкциям производителя. Разработку праймеров осуществляли в программе Primer Blast на базе NCBI. Синтез праймеров осуществлялся компанией «Праймтех» (Беларусь). Для амплификации гена *abcc1* использовали праймеры F*abcc1* (5`-AGA AGG AAT GCG CCA AGA CT-3`) и R*abcc1* (5`-GTC GTG GAT GGC CTT GAA GA-3`), гена *abcg2* — F*abcg2* (5`-GCA CCT ATA ACC AGT CCC AGTA-3`) и R*abcg2* (5`-CAG ATG GGT TTC CAA GCG TTC-3`), гена *tp53* — F*tp53* (5`-GTG GAT GGT GGT ACA GTC AGA-3`) и R*tp53* (5`-GGA AGG AAA TTT GCG TGT GGA-3`), гена *rps18* — F*rps18* (5`-CCC TGA AAA GTT CCA GCA TA-3`) и R*rps18* (5`-CAC CAC ATG AGC ATA TCT TCG-3`).

ПЦР проводили с помощью реактива ArtMix-RT Color компании «АртБиоТех» (Беларусь) согласно инструкции производителя на программируемом амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler BIO-RAD (США). Параметры реакции и состав реакционной смеси подбирали согласно рекомендациям производителя. Изменение уровня экспрессии генов рассчитывали по методу [25].

Для визуализации результатов выделения тотальной РНК и проведения ПЦР в реальном времени использовался электрофорез в агарозном геле. Электрофоретический анализ проводили согласно стандартным протоколам [24], в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler DNA LadderMix ThermoScientific (США).

Результаты и обсуждение

В предыдущих исследованиях было показано, что штаммы бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* синтезируют ФКК и некоторые ее производные в различных соотношениях в зависимости от штамма [19]. В ходе данной работы были получены очищенные препараты феназиновых соединений различных штаммов бактерий для дальнейшего исследования их цитотоксической активности.

В связи с низкой растворимостью феназинов в большинстве полярных растворителей при нор-

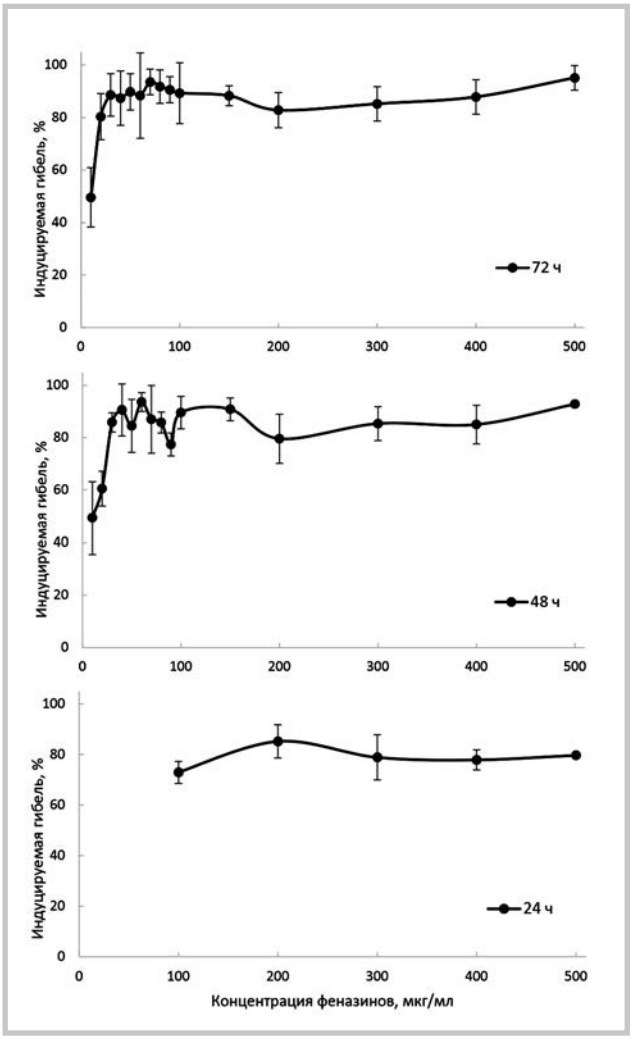

Рис. 1. **Зависимость лекарственно-индуцируемой гибели (%) клеток линии HeLa от концентрации феназинов бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* штамма B-162/255/15 при инкубации в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч.**

мальном pH, а также высокой токсичностью для эукариотических клеток ряда полярных растворителей на первом этапе работы была проведена серия предварительных экспериментов для подбора растворителя выделенных феназинов. В качестве растворителей были протестированы диметилсульфоксид (ДМСО), хлороформ, глицерин и этанол 70%. Показано, что ДМСО и хлороформ в объемах, соответствующих концентрации феназинов 100 мкг/мл, являются цитотоксичными для культуры клеток HeLa. Дополнительно продемонстрирована ограниченная способность ДМСО растворять соединения феназинового ряда: при приготовлении раствора с концентрацией 150 мкг/мл образуется осадок, что свидетельствует о перенасыщенности раствора. Глицерин, так же как и ДМСО, ограниченно растворяет феназиновые соединения, а его вязкость затрудняет работу и влияет на воспроизводимость результатов. В отличие от предыдущих растворителей 70% этиловый спирт продемонстрировал высокую способность растворять феназиновые соединения. Также было установлено, что используемые объемы 70% этанола (концентрация в экспериментальной лунке составляла не более 10%) не являлись токсичными для исследуемой культуры клеток в отличие от исследованных в этом отношении ДМСО и хлороформа. Исходя из полученных данных, в качестве растворителя для феназиновых комплексов был выбран этанол 70%. Можно было полагать, что зарегистрированная в ходе последующих экспериментов гибель опухолевых клеток является преимущественно следствием действия феназиновых соединений.

Для первичной оценки эффективных концентраций исследуемых соединений в серии экспериментов был использован препаративный комплекс феназинов, выделенных из одного из наиболее продуктивных штаммов — B-162/255/15. Исследуемые концентрации феназинов находились в диапазоне от 10 мкг/мл до 500 мкг/мл с шагом 10 мкг/мл. Инкубацию клеток с феназиновыми комплексами проводили в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч.

Установлено **(рис. 1)**, что процент гибели клеток растет при увеличении концентрации феназинов от 10 до 50 мкг/мл при максимальном времени инкубации (72 ч). После достижения концентрации в 50 мкг/мл дальнейшее ее увеличение слабо меняет процент гибели клеток, который колеблется в пределах 80—95%. Максимальный процент гибели клеток регистрировался при концентрации в 100 мкг/мл. При инкубации в течение 24 ч процент гибели клеток не превышал 80% при максимальной исследуемой концентрации. Исходя из полученных результатов, в качестве тестируемой цитотоксической концентрацией феназинов для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация 100 мкг/мл, LD50 составляет 10 мкг/мл. Микроскопический анализ подтверждает массовую гибель клеток культуры после обработки феназинами **(рис. 2, см. https://mediasphera.ru/upload/medialibrary/files/Mol_genetika_2023_04_06_add.zip)**.

Полученные результаты соотносятся с литературными данными. Так, другими исследователями было показано, что феназиновые производные вызывают 80% гибель клеток в культуры линии Caco-2 при концентрации 69 мкг/мл в течение 72 ч [26]. 2,3,7-замещенные феназиновые производные, эффективные против клеток линии Mia PaCa-2, имеют значения LD50 от 20 до 75 мкг/мл. Одновременно с этим гемзар — одобренный препарат для лечения онкологических заболеваний, содержащий в качестве активного компонента гемцитабин, приводит к 50% гибели культуры при концентрациях, превышающих 200 мкг/мл [12]. Это демонстрирует перспективность использования феназиновых производных, продуцируемых микроорганизмами, в том числе *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, в качестве основы для разработки цитотоксических препаратов.

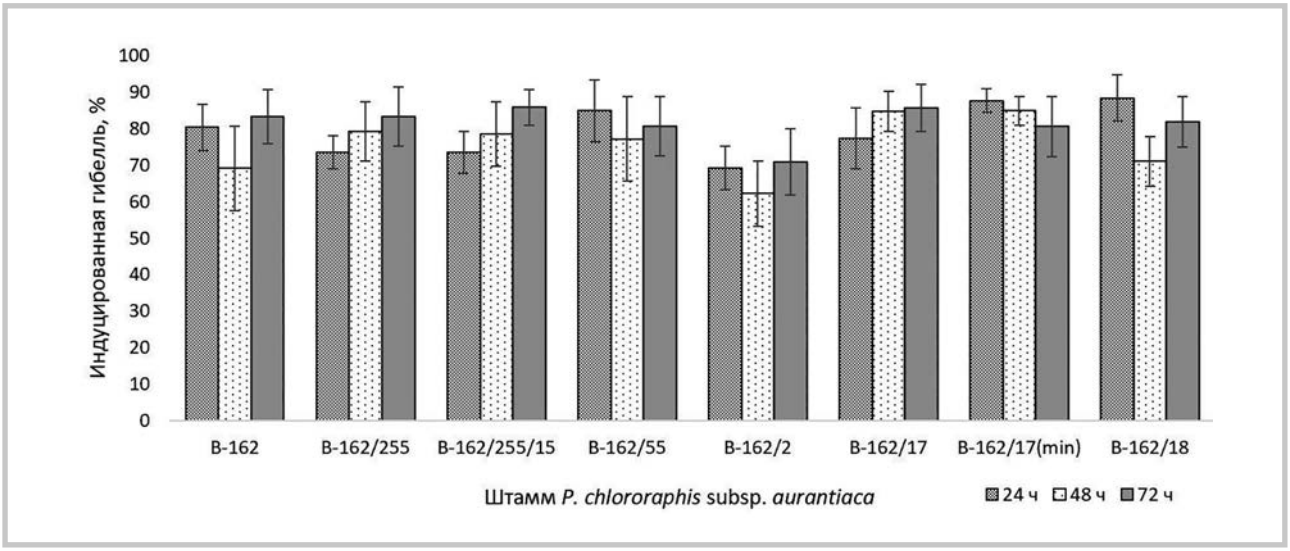

Рис. 3. **Зависимость лекарственно-индуцируемой гибели клеток линии HeLa от штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* и времени инкубации.**

На следующем этапе работы была проведена серия экспериментов по изучению цитотоксических свойств феназинов других штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* в отношении клеток линии HeLa. Тестируемая концентрация феназиновых комплексов составляла 300 мкг/мл. Выбранное значение концентрации обусловлено тем, что в ранее проведенных в нашей лаборатории экспериментах было показано, что штамм В-162/255/15 обладает одним из самых высоких уровней антибиотической активности в отношении микроорганизмов и грибов родов *Aspergillus*, *Trychophyton* и *Acremonium* [27]. В связи с этим предполагалось, что действующие концентрации феназиновых комплексов других штаммов в отношении эукариотических клеток могут оказаться выше. Время инкубации — 24 ч, 48 ч и 72 ч. Показано, что феназины всех штаммов в концентрации 300 мкг/мл индуцируют гибель культуры клеток HeLa 70—80% **(рис. 3)**. При этом зависимость процента гибели клеток от времени инкубации прослеживается не четко, что, вероятно, связано с тем, что при 300 мкг/мл достигается гибель, приближенная к максимально возможной вне зависимости от времени инкубации.

Полученные цитологические препараты отдельных клеток культуры HeLa после обработки феназиновыми соединениями штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* демонстрируют цитологические признаки индукции апоптоза. Так, было зарегистрировано образование апоптотических телец **(рис. 4, см. https://mediasphera.ru/upload/medialibrary/files/Mol_genetika_2023_04_07_add.zip)**.

Одним из ключевых белков, ответственных за инициацию апоптотической гибели малигнизированных клеток и осуществляющих таким образом защиту организма, является P53. Белок P53 является транскрипционным фактором, который при наличии геномных повреждений запускает экспрессию генов систем репарации или индукции апоптоза [28]. Активация соответствующего гена в культуре HeLa после обработки феназинами могла бы объяснить наблюдаемые цитологические эффекты. Для оценки уровня экспрессии гена *tp53* была проведена ПЦР в реальном времени. В качестве контрольного гена был выбран ген домашнего хозяйства *rps18*, кодирующий рибосомный белок S18, входящий в состав малой (40S) субъединицы рибосомы. Для проведения анализа было осуществлено выделение тотальной РНК из образцов культур клеток HeLa, обработанных и не обработанных соединениями феназинового ряда штаммов В-162 и В-162/255/15 в концентрации 300 мкг/мл (72 ч). Примечательно, что в тотальной РНК из клеток, обработанных феназинами, отсутствуют бэнды рРНК, в то время как в контрольных образцах они имеются **(рис. 5)**. Такая закономерность проявлялась во всех повторностях эксперимента. Это может указывать на потенциально возможный дополнительный механизм действия феназинов бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, заключающийся в подавлении синтеза рРНК в культуре клеток HeLa.

Установлено, что обработка культуры клеток HeLa феназиновыми соединениями бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* приводит к увеличению экспрессии в них гена *tp53* почти в 13 раз. Одновременно с этим в контрольных образцах уровень экспрессии *tp53* был крайне низким или экспрессия вовсе не регистрировалась. Это согласуется с ранее полученными данными [29] о том, что во многих малигнизированных линиях уровень экспрессии данного ключевого гена является крайне низким, что, вероятно, и является одной из причин малигнизации. Таким образом, можно полагать, что соединения феназинового ряда способны индуцировать апоптотическую ги-

бель клеток линии HeLa, в том числе путем активации работы супрессора опухолей P53.

На следующем этапе работы была проведена оценка уровня экспрессии генов ABC-транспортеров (*abcc1*, *abcg2*). Их продуктами являются белки MRP1 (от англ. multidrug resistance protein), или ABCC1, и BCRP (от англ. breast cancer resistance protein), или ABCG2. Известно, что продукты этих генов участвуют в формировании множественной лекарственной резистентности клеток опухолей, способствуя выведению лекарственных соединений из клеток [30]. Активация этих генов при обработке культуры HeLa феназинами может являться маркером того, что у опухолевых клеток достаточно быстро может сформироваться резистентность к феназиновым соединениям. Однако нами было зарегистрировано незначительное снижение уровня экспрессии генов ABC-транспортеров (*abcc1* и *abcg2*). На основании полученных данных можно полагать, что ABC-транспортеры не используются клетками линии HeLa для экскреции феназинов.

Заключение

На основании полученных экспериментальных данных можно утверждать, что феназиновые соединения *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* проявляют выраженную цитотоксичность в отношении малигнизированных клеточных линий HeLa. Все исследуемые штаммы вызывают 70—80% гибель культуры при концентрации феназиновых соединений 300 мкг/мл. Преимущественным типом гибели клеток является апоптоз. Подтверждением этому служат цитологические препараты, на которых обнаружены клетки HeLa с признаками апоптотической гибели после обработки феназиновыми соединениями. Более того, зафиксировано увеличение экспрессии гена *tp53* в 13 раз, продукт которого является активатором группы генов, ответственных за остановку клеточного цикла, репликации ДНК и запуск апоптоза.

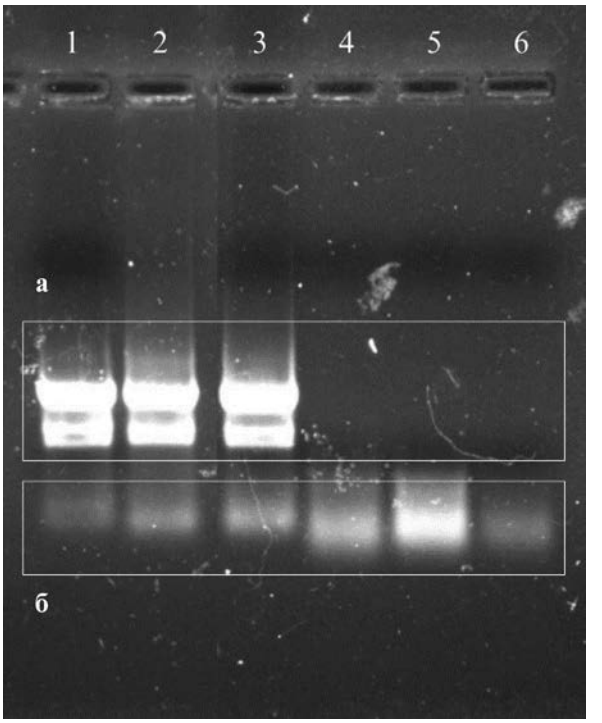

Рис. 5. **Электрофореграмма тотальной РНК, выделенной из клеток линии HeLa.**

1—3 — контроль; 4—5 — после 72 ч инкубации с феназинами штамма B-162; 6 — после инкубации с феназинами штамма B-162/255/15 (300 мкг/мл, 72 ч); а — зона рРНК; б — зона малых РНК.

Финансирование работы

Данное исследование в финансовом отношении было поддержано Государственной программой научных исследований Республики Беларусь (проект №20211293).

Соблюдение этических стандартов

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pierson LS, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;86(6):1659-1670. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2509-3
2. Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol.* 2006;44:417-445. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710
3. Laursen JB, Nielsen J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem Rev.* 2004;104(3):1663-1685. https://doi.org/10.1021/cr020473j
4. Guttenberger N, Blankenfeldt W, Breinbauer R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(22):6149-6166. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.002
5. Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV, Parejko JA, Lemanceau RP, Mazurier S, et al. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Appl Envir Microbiology*. 2010;76(3):866-879. https://doi.org/10.1128/AEM.02009-09
6. Huigens RW, Brummel BR, Tenneti S, Garrison AT, Xiao T. Pyrazine and phenazine heterocycles: platforms for total synthesis and drug discovery. *Molecules*. 2022;27(3):1112-1136. https://doi.org/10.3390/molecules27031112

7. Dasgupta D, Kumar A, Mukhopadhyay B. Isolation of phenazine 1,6-di-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain HRW.1-S3 and its role in biofilm-mediated crude oil degradation and cytotoxicity against bacterial and cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(20):8653-8665. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6707-x
8. Cimmino A, Evidente A, Mathieu V, Andolfi A, Lefranc F, Kornienkod A, Kiss R. Phenazines and cancer. *Nat Prod Rep.* 2012;29(4):487-501. https://doi.org/10.1039/C2NP00079B
9. Patil S, Paradeshi J, Chaudhari B. Anti-melanoma and UV-B protective effect of microbial pigment produced by marine *Pseudomonas aeruginosa* GS-33. *Nat Prod Res.* 2016;30(24):2835-2839. https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1154057
10. Vipin C, Ashwini P, Kavya AV, Rekha PD. Overproduction of Pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* by Supplementation of Pathway Precursor Shikimic acid and Evaluation of its Activity. *Res Jour of Pharm and Techn.* 2017;10(2):533-536. https://doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00106.8
11. Myhren LE, Nygaard G, Gausdal G, Sletta H, Teigen K, Degnes KF, et al. (1,6-Dihydroxyphenazine 5,10-Dioxide) from *Streptosporangium* sp. Induces Apoptosis Selectively in Myeloid Leukemia Cell Lines and Patient Cells. *Mar Drugs.* 2013;11(2):332-349. https://doi.org/10.3390/md11020332
12. Moris MA. 2,3-Dialkoxyphenazines as anticancer agents. *Tetrahedron Lett.* 2015;56(21):2695-2698. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.04.003
13. Веремеенко Е.Г. *Анализ биологической активности антибиотиков феназинового ряда в отношении представителей рода Candida*. Женщины-ученые Беларуси и Казахстана: сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 2018. Мн: РИВШ; 2017:391-394. Ссылка активна на 30.10.23.
Veremeenko EG. *Analysis of The Biological Activity of Phenazine Antibiotics in Relation to Representatives of The Genus Candida*. Women scientists of Belarus and Kazakhstan: collection of materials of the Intern. Scien. and Pract. Conf., Minsk, 2018. Mn: RIHS; 2017:391-394. (In Russ.). Accessed October 30, 2023. https://elib.bsu.by/handle/123456789/196016
14. Junjie Y, Liu W, Cai J, Wang Y, Li D, Hua H, Cao H. Advances in Phenazines over the Past Decade: Review of Their Pharmacological Activities, Mechanisms of Action, Biosynthetic Pathways and Synthetic Strategies. *Mar Drugs.* 2021;19(11):610. https://doi.org/10.3390/md19110610
15. Kennedy RK, Veena V, Naik P.R, Lakshmi P, Krishna R, Sudharani S, Sakthivel N. Phenazine-1-carboxamide (PCN) from *Pseudomonas* sp. strain PUP6 selectively induced apoptosis in lung (A549) and breast (MDA MB-231) cancer cells by inhibition of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *Apoptosis.* 2015;20(6):858-868. https://doi.org/10.1007/s10495-015-1118-0
16. Веремеенко Е.Г., Лысак В.В., Максимова Н.П. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca*, способных к сверхсинтезу феназиновых антибиотиков при культивировании в минимальной среде. *Вестник БГУ. Биология. Серия 2.* 2010;2:47-53. Ссылка активна на 30.10.23.
Veremeenko EG, Lysak VV, Maksimova NP. Preparation and characterization of *Pseudomonas aurantiaca* mutants capable of super synthesis of phenazine antibiotics when cultured in a minimal medium. *Vestnik BGU. Biologiya. Seriya 2.* 2010;2:47-53. (In Russ.). Accessed October 30, 2023. https://elib.bsu.by/handle/123456789/2742
17. Levitch ME. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains. *J Bacteriol.* 1970;103(1):16-19. https://doi.org/10.1128/jb.103.1.16-19.1970
18. Gallager SR, Wiley EA. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Wiley-Blackwell; 2008. Accessed October 30, 2023. https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/journal/19483430
19. Shapira MA, Verameyenka KG, Liavonchyk KV, Dobysh AA, Yantsevich AV, Maksimova NP. Novel approach of phenazine derivatives isolation from *Pseudomonas* culture medium. *Process Biochemistry*. 2021;111(2):325-331. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.004
20. Taniguchi M, Lindsey JS. Database of Absorption and Fluorescence Spectra of >300 Common Compounds for use in PhotochemCAD. *Photochem Photobiol*. 2018;94(2):290-327. https://doi.org/10.1111/php.12860
21. Freshney RJ. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. Wiley-Blackwell; 2018. Accessed October 30, 2023. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470649367
22. Зворыгин И.А. Статистический анализ лабораторных данных. *Новости «Вектор-Бест»*. 2006;39(1):11-25. Ссылка активна на 30.10.23.
Zvorygin IA. Statistical analysis of laboratory data. *Vector-Best News*. 2006; 39(1):11-25. (In Russ.). Accessed October 30, 2023. https://vector-best.ru/publ/nvb.php
23. Черепович В.С. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности. *Медицинский журнал БГМУ*. 2006;2:106-108. Ссылка активна на 30.10.23.
Cherepovich VS. Optimization of critical parameters of the MTT test to assess cellular and drug cytotoxicity. *Medical Journal of BSMU.* 2006;2:106-108. (In Russ.). Accessed October 30, 2023. https://rep.bsmu.by/handle/BSMU/4509
24. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2003:1600. Accessed October 30, 2023. https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/journal/19343647
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
26. Pachon OG, Azqueta A, Lavaggi ML, Lopez de Cerain A, Creppy E, Collins A, et al. Antitumoral Effect of Phenazine N5, N10-Dioxide Derivatives on Caco-2 Cells. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(8):1578-1585. https://doi.org/10.1021/tx800032k
27. Савонь Е.Л., Леончик Е.В., Пигуль П.Г., Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П. *Антифунгальная активность очищенных комплексов феназиновых соединений.* Материалы межд. научн.-практич. конф. «Биотехнологии микроорганизмов». Минск. 2019:386-387. Ссылка активна на 30.10.23.
Savon EL, Leonchik EV, Pigul PG, Veremeenko EG, Maksimova NP. *Antifungal activity of purified complexes of phenazine compounds.* Materials of Intern. Scien. Res.-practical conf. "Biotechnologies of microorganisms". Minsk. 2019:386-387. (In Russ.). https://elib.bsu.by/handle/123456789/251769
28. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ.* 2019;26(2):199-212. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9
29. Correa I, Cerbon MA, Salazar A, Solano JD, García-Carranca A, Quintero A. Differential p53 protein expression level in human cancer-derived cell lines after estradiol treatment. *Arch Med Res.* 2002;33(5):455-449. https://doi.org/10.1016/s0188-4409(02)00386-7
30. Ставровская А.А., Рыбалкина Е.Ю. Новое о молекулярных механизмах регуляции множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. *Биохимия*. 2018;83(7):963-971. Ссылка активна на 30.10.23.
Stavrovskaya AA, Rybalkina EYu. New on The Molecular Mechanisms of Regulation Of Multidrug Resistance Of Tumor Cells. *Biochemistry*. 2018;83(7):963-971. (In Russ.). Accessed October 30, 2023. https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/2018/83-07-0963

Поступила 30.10.2023
Received 30.10.2023
Принята к печати 13.11.2023
Accepted 13.11.2023

Приложение к статье *А.А. Жизневской и соавт.* «Цитотоксическая активность феназиновых соединений *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* в отношении культуры клеток HeLa»

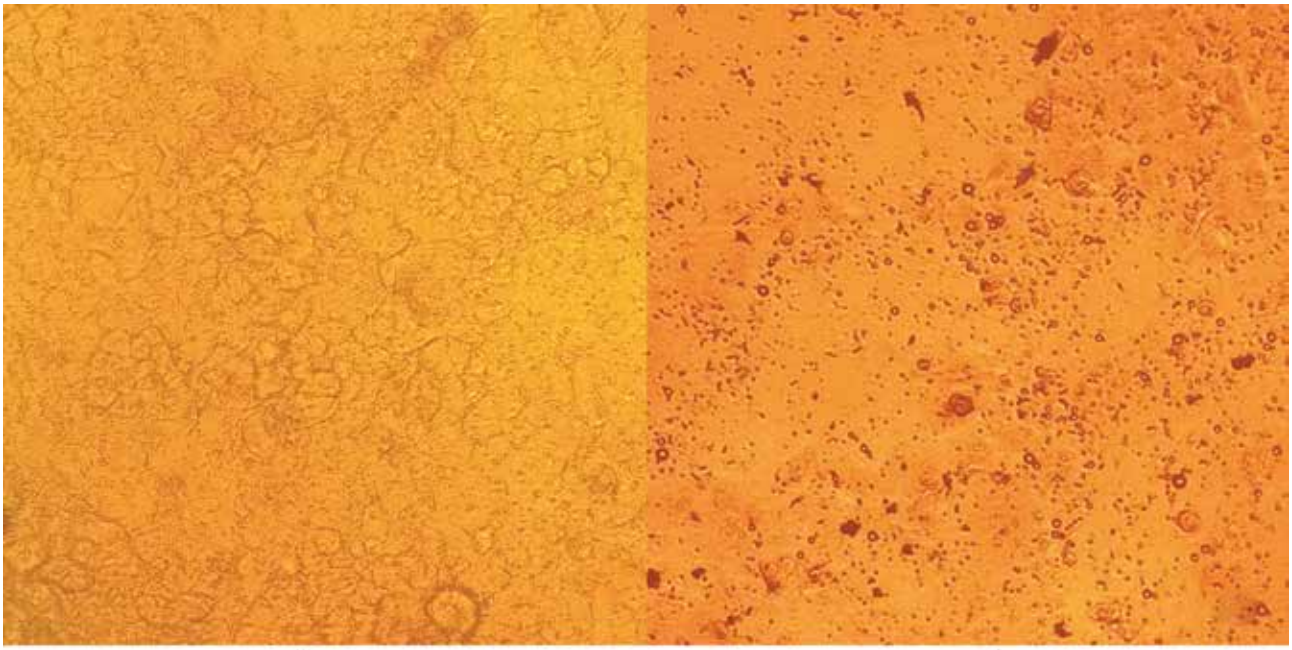

Рис. 2. **Микроскопические фотографии клеток HeLa в контроле (а) и после обработки феназинами в концентрации 100 мкг/мл (б).**

Инвертированный микроскоп Axiostar plus ZEISS (Германия). Объектив A-Plan 32×/0.25 Ph 1 Var ZEISS (Германия).

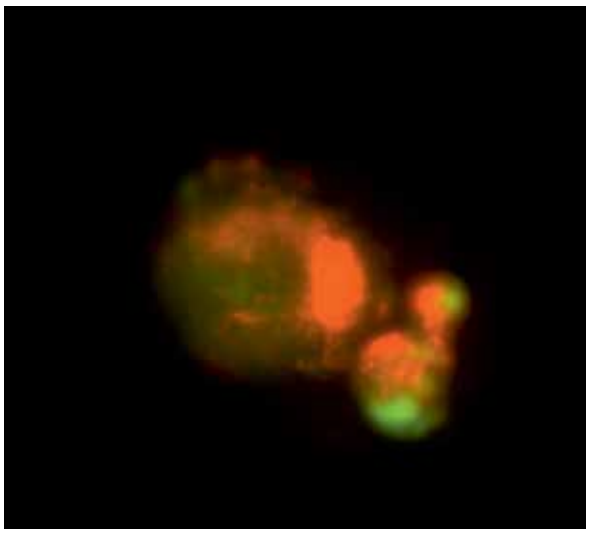

Рис. 4. **Клетка линии HeLa после обработки феназинами в концентрации 50 мкг/мл.**

Окрашивание акридиновым оранжевым. Микроскоп Eclipse 50i Nikon (Япония), объектив Plan Fluor Nicon (Япония) 20×/0.50 DIC M/N2 WD 2.1.