ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПОТЕНЦИАЛА СОЕДИНЕНИЙ ФЕНАЗИНОВОГО РЯДА БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AURANTIACA

А. А. Жизневская

Белорусский государственный университет, г. Минск;
anastasia.zhyzneyskaya@gmail.com;
науч. рук. – Е. Г. Веремеенко, канд. биол. наук, доц.

Онкологические заболевания являются серьезной проблемой для современной медицины. Высокая смертность пациентов обусловлена быстрым прогрессированием опухолей, низкой эффективностью препаратов наряду с их токсичностью в отношении нормальных клеток организма, а также высокой частотой рецидивов. Поэтому разработка высокоэффективных противоопухолевых препаратов по-прежнему остается актуальной. Большой интерес в этом отношении вызывают ароматические гетероциклические соединения. Одним из представителей этой группы являются соединения феназинового ряда. Целью данного исследования являлся анализ цитотоксических свойств феназинов в отношении малигнизированных клеточных линий. Определены цитотоксические концентрации феназинов, выделенных из штамма *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/15 в отношении линий клеток HeLa и M-21. С целью предварительного определения типа клеточной гибели получены цитологические препараты клеток HeLa до и после обработки соединениями феназинов.

Ключевые слова: феназины; цитотоксическая активность; HeLa; M-21; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

ВВЕДЕНИЕ

Феназины представляют собой большую группу азотсодержащих гетероциклических веществ [1]. Они являются вторичными метаболитами бактерий, обеспечивающими последним конкурентное преимущество в занимаемой экологической нише [2]. Синтез феназинов характерен для бактерий родов *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia* и др. Показано также наличие особых типов феназинов (метанофеназинов) у архей рода *Methanosarcina* [3]. Создание продуцентов феназиновых соединений обычно проводят на основе бактерий родов *Streptomyces* и *Pseudomonas*, которые обладают высоким природным уровнем синтеза этих метаболитов, а также разнообразием природных производных данных соединений [1, 4].

Феназины характеризуются широким спектром активностей за счет разнообразия заместителей, связанных с ароматическим ядром. Вследствие этого они проявляют не только антимикробное действие, но также имеют нейропротекторные и антиоксидантные свойства.

Производные феназинов активно используются в медицинской практике как противорвотные средства и нейролептики, а также в ветеринарии в качестве глистогонных препаратов [5].

Несмотря на то, что механизмы действия феназинов довольно разнообразны, основным из них является генерация активных форм кислорода. Так, феназины легко могут вызвать окислительный стресс и гибель клеток, что является одним из механизмов конкурентного действия их продуцентов. 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 активность топоизомераз I и II в эукариотических клетках. Поскольку раковые клетки интенсивно делятся, им необходимы высокие уровни активности обеих топоизомераз, поэтому такие клетки будут более восприимчивы к действию феназинов [3]. В связи с этим феназиновые антибиотики являются перспективными для исследования их противоопухолевого потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы клетки линии HeLa (перевиваемая линия карциномы шейки матки) и М-21 (перевиваемая линия меланомы человека), культура клеток бактерий штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/15. Культивирование бактерий и клеток опухолей проводилось согласно стандартным протоколам. Выделение и очистку феназиновых соединений проводили по методике твердофазной экстракции, предложенной в [1]. Оценку цитотоксического эффекта феназинов осуществляли с использованием МТТ-теста. Цитологические препараты получали путем окрашивания клеток раствором акридинового оранжевого.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрации феназинов, взятые для исследования, находились в диапазоне от 10 мг/л до 500 мг/л с шагом 10 мг/л. Инкубацию культур клеточных линий HeLa и М-21 с препаратами феназинов проводили в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч. Для растворения феназинов выбран 70% спирт. В серии предварительных экспериментов было установлено, что используемые объемы 70% спирта (менее 40 мкл/200 мкл среды) не являлись токсичными для исследуемых культур клеток. Таким образом,

зарегистрированная гибель опухолевых клеток является следствием действия только феназиновых комплексов.

Установлено, что в культуре клеток HeLa концентрации феназинов ниже 50 мг/л не оказались эффективными. При концентрации феназинов в 300 мг/л гибель клеток составляла 90%, 400 мг/л – 95%, 500 мг/л – 98% при инкубации в течение 72 ч. При инкубации в течение 24 ч гибель клеток не превышала 70% при максимальной концентрации.

Для культуры клеток линии М-21 концентрации феназинов ниже 60 мг/л не проявили цитотоксического эффекта. Однако уже при концентрации в 200 мг/л зарегистрирована 99% гибель клеток за время инкубации в течение 72 ч.

Микроскопический анализ подтверждает массовую гибель культуры после обработки феназинами (рис. 1 Б).

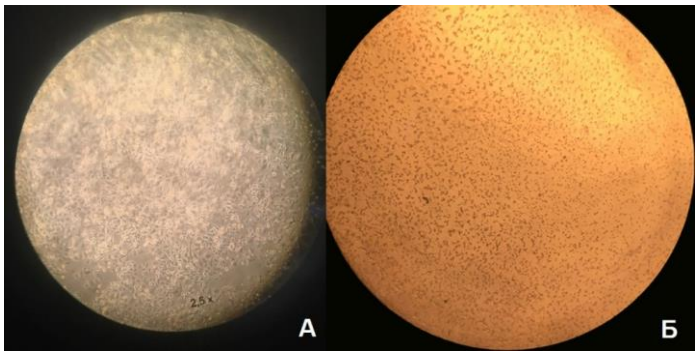

Рис. 1. Микроскопические фотографии клеток HeLa в контроле (А) и после обработки феназинами в концентрации 500 мкг/мл (Б).
Инвертированный микроскоп Axiostar plus (ZEISS, Германия). Объектив A-Plan 10x/0.25 Ph 1 Var (ZEISS, Германия)

Также были получены цитологические препараты культур клеток HeLa без обработки и после обработки препаратами феназиновых комплексов (рис. 2).

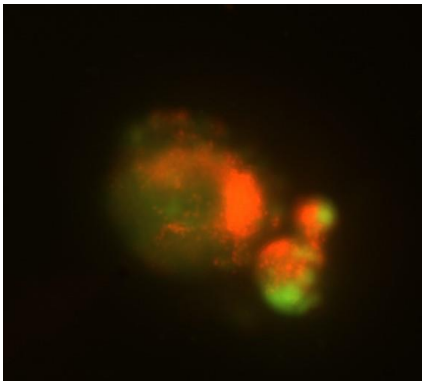

Рис. 2. Клетка линии HeLa после обработки феназинами в концентрации 50 мкг/мл.
Микроскоп Nikon eclipse 50i, объектив Plan Fluor 20x/0.50 DIC M/N2 WD 2.1

На фотографии видно образование апоптотических телец. Таким образом, преимущественный тип клеточной гибели после обработки феназинами – апоптоз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были получены высокоочищенные препараты феназинов из культур бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. На основании проведенного анализа можно утверждать, что феназиновые комплексы, выделенные из штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B162/15, проявляют выраженную цитотоксическую активность в отношении малигнизированных клеточных линий HeLa и M-21. Цитотоксические концентрации препаратов составили 500 мкг/мл для культуры клеток HeLa и 200 мкг/мл – для культуры клеток M-21. Наблюдается закономерное увеличение ингибирующего воздействия феназинов с увеличением времени инкубации. Также было установлено, что преимущественным типом гибели при действии феназинов в культуре клеток HeLa является апоптоз.

Библиографические ссылки

1. Phenazines and cancer / A. Cimmino [et al.] // Nat. Prod. Rep. – 2012. – Vol. 29, № 4. – P. 487.
2. Mavrodi, D.V. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway / D.V. Mavrodi [et al] // Appl. Envir. Microbiology. – 2010. – V. 76, № 3. – P. 866–879.
3. *Pierson, L. S.* Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes / L.S. Pierson, E.A. Pierson // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 86, № 6. – P. 1659–1670.
4. Laursen, J.B. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity / J.B. Laursen, J. Nielsen // Chem. Rev. – 2004. –V. 104. – P. 1663–1685.
5. *Веремеенко, Е. Г.* Анализ биологической активности феназинового комплекса бактерий Pseudomonas chlororaphis subsp. Aurantiaca в отношении нормальных и малигнизированных клеточных линий / Е.Г. Веремеенко, Е.В. Леончик, Н.П. Максимова // Журн. БГУ Биология. – 2017. – № 3. – С.14-20.