

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕНАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* В ОТНОШЕНИИ КУЛЬТУР НОРМАЛЬНЫХ И МАЛИГНИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК

А. А. Жизневская

anastasia.zhyzneyskaya@gmail.com;

Научный руководитель – Е. Г. Веремеенко, кандидат биологических наук, доцент

Проведено исследование цитотоксического эффекта феназинов различных штаммов бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* в отношении линий клеток HeLa и первичной культуры гепатоцитов мыши. Показана высокая устойчивость гепатоцитов и низкая устойчивость клеток линии HeLa к исследованным феназиновым комплексам.

Ключевые слова: вторичные метаболиты; феназины; цитотоксическая активность; HeLa; *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

ВВЕДЕНИЕ

Феназины представляют собой большую группу природных и химически синтезированных азотсодержащих гетероциклических веществ, являющихся вторичными метаболитами бактерий, обеспечивающими продуцентам конкурентное преимущество в занимаемой экологической нише [1]. Синтез феназинов характерен для представителей родов *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, а также некоторых морских микроорганизмов и архей рода *Methanosarcina* [2, 3].

Ядром феназинов является пиразиновое кольцо, к которому присоединены разнообразные заместители, что опосредует огромное разнообразие биологических активностей данных соединений [4]. Феназины обладают антибиотическим, цитотоксическим, противогрибковым, инсектицидным и противопаразитарным эффектами. Их производные активно используются в медицинской практике как противорвотные, гипотензивные средства, нейролептики, в ветеринарии в качестве глистогонных препаратов. Клофазимин – препарат, который оказывает бактерицидное действие на *Mycobacterium leprae* [5, 6].

Основным механизмом действия феназинов является генерация активных форм кислорода и последующая гибель чувствительных клеток. Некоторые производные феназинов ингибируют действие топоизомераз I и II. Поскольку эти ферменты наиболее активны в клетке во время деления, подавление их активности особенно влияет на интенсивно делящиеся опухолевые клетки [7]. В связи с этим феназины являются перспективными для исследования их противоопухолевого потенциала.

Целью данного исследования являлась оценка и сравнение цитотоксического эффекта феназинов различных штаммов бактерий рода *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* в отношении малигнизированных клеточных линий и первичных культур нормальных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы клетки линии HeLa (перевиваемая линия карциномы шейки матки), первичная культура гепатоцитов мыши, культуры клеток различных штаммов бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. Культивирование бактериальных и эукариотических клеток проводилось согласно стандартным протоколам. Получение первичной культуры гепатоцитов осуществлялось методом эксплантов. Выделение и очистка феназиновых соединений проводилась по методике твердофазной экстракции. Оценка цитотоксического эффекта феназинов осуществлялась с использованием МТТ-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В серии предыдущих экспериментов был проанализирован цитотоксический эффект разных концентраций феназинов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162/255/15 в отношении культуры HeLa. Было установлено, что выраженное цитотоксическое действие начиналось при концентрации 300 мкг/мл. Инкубацию культур клеток с феназинами проводили в течение 24, 48 и 72 ч. Соединения растворялись в 70% спирте. Было установлено, что используемые объемы 70% спирта (не более 20 мкл на лунку 200 мкл) не являлись токсичными. Поэтому зарегистрированная гибель клеток является следствием действия только феназиновых комплексов.

Установлено, что в концентрации 300 мкг/мл феназины вызывают 70–90% гибель культуры клеток HeLa в зависимости от состава феназинового комплекса, который различен у разных штаммов-продуцентов. Наибольший эффект достигается при инкубации в течение 72 ч. Микроскопический анализ подтверждает массовую гибель культуры после обработки феназинами (рис. 1 Б).

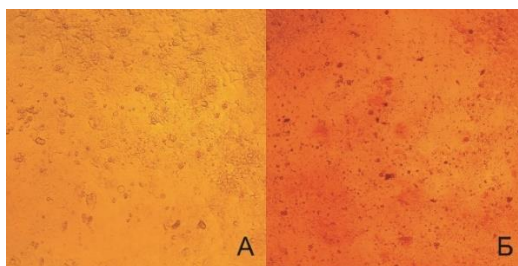


Рис. 1. Микроскопические фотографии клеток HeLa в контроле (А) и после обработки феназинами штамма В-162/255/15 в концентрации 300 мкг/мл (Б). Инвертированный микроскоп Axiostar plus (ZEISS, Германия). Объектив A-Plan 10x/0.25 Ph 1 Var (ZEISS, Германия)

Важной составляющей любого противоопухолевого препарата является его низкая токсичность в отношении нормальных клеток организма, для данной работы была получена первичная культура гепатоцитов мыши. Инкубацию культур клеток печени с феназинами в концентрации 300 мкг/мл проводили в течение 72 ч. Инкубация в течение 24 и 48 ч к гибели не приводила. Согласно данным МТТ-теста, процент гибели нормальных клеток составил в среднем около 12%. При этом феназины штаммов В-162, В-162-55 и В-162-18 фактически не приводили к гибели (3–4%), а феназины штамма В-162-17 индуцировали максимальную гибель культуры, которая составила 20–25%. Микроскопический анализ подтверждает сохранение жизнеспособности культуры без признаков индукции апоптоза (рис. 2).

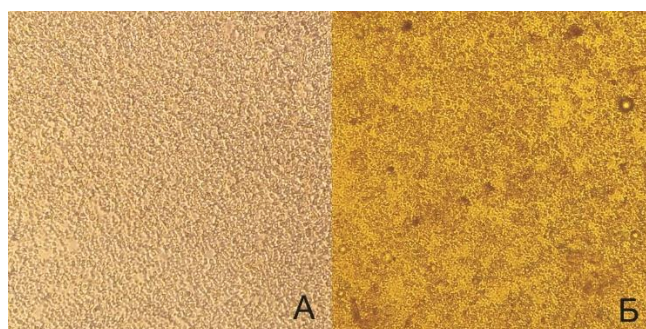


Рис. 2. Микроскопические фотографии гепатоцитов мыши в контроле (А) и после обработки феназинами штамма В-162 в концентрации 300 мкг/мл (Б). Инвертированный микроскоп Axiostar plus (ZEISS, Германия). Объектив А-Plan 10x/0.25 Ph 1 Var (ZEISS, Германия)

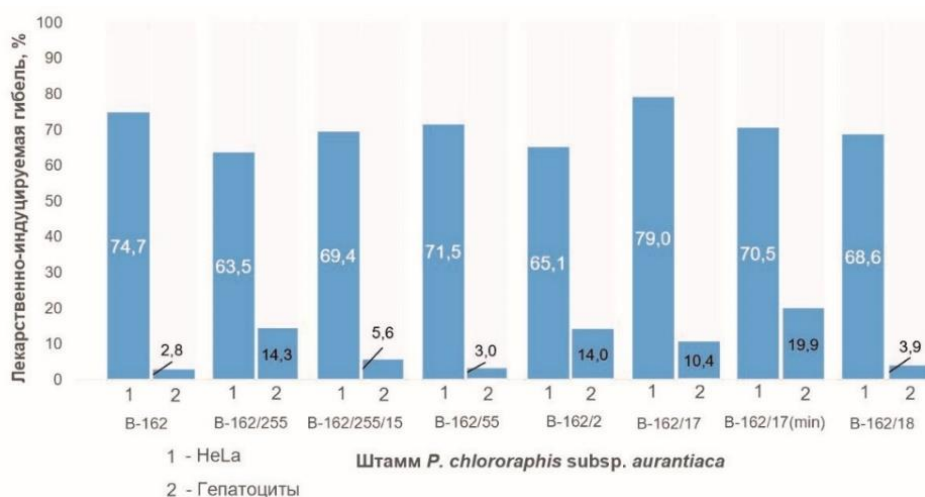


Рис. 3. Гибель культуры HeLa и гепатоцитов мыши при обработке феназинами в концентрации 300 мкг/мл и инкубации в течение 72 ч

Сравнение цитотоксического эффекта феназинов в отношении культур HeLa и гепатоцитов мыши (рис. 3) демонстрирует

перспективность их исследования в качестве противоопухолевых препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что культура гепатоцитов мыши обладает высоким уровнем устойчивости к феназиновым соединениям исследуемых штаммов. Клетки малигнизированной линии HeLa в таких же условиях демонстрируют повышенную чувствительность к феназинам и высокий процент клеточной гибели. Наиболее перспективными для дальнейшего исследования штаммами являются В-162/55 и В-162/18, которые приводят к 70% гибели клеток HeLa и не вызывают гибели нормальных клеток печени.

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. Guttenberger, N. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products/ N. Guttenberger, W. Blankenfeldt, R. Breinbauer // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25, № 22. P. 6149–6166.
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.
6. Pyrazine and phenazine heterocycles: platforms for total synthesis and drug discovery / R.W. Huigens [et al.] // Molecules. 2022. V. 27, № 3. P. 1112–1136.
7. 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.