

УДК 579.841.11579.236

АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕНАЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AURANTIACA* В ОТНОШЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ И МАЛИГНИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Е. Г. ВЕРЕМЕЕНКО¹⁾, Е. В. ЛЕОНЧИК¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Выделены и проанализированы водорастворимые и жирорастворимые фракции феназиновых антибиотиков из штамма *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162 и полученных на его основе штаммов-продуцентов, способных к сверхпродукции феназинов. Анализ цитотоксической и цитостатической активностей выделенных водорастворимых феназиновых комплексов показывает, что малигнизированные клетки проявляют к данным соединениям гораздо большую чувствительность по сравнению с нормальными клетками. В подтверждение этого был проведен микроскопический анализ образцов культур малигнизированных и нормальных клеток, подвергшихся обработке различными фракциями феназиновых антибиотиков, выделенных из исследуемых штаммов. Он показал, что на вторые сутки культивирования в культурах малигнизированных линий появляется большое количество клеток (от 7 до 96 %), погибающих путем апоптоза, реже – некроза, тогда как в культуре фибробластов такого массового цитотоксического эффекта обнаружено не было. Цитотоксичность жирорастворимых фракций крайне высока для всех исследованных культур клеток, что может быть связано с присутствием диметилсульфоксида (ДМСО) и его способностью усиливать цитотоксические свойства феназинов.

Ключевые слова: твердофазная экстракция; феназины; фибробласты мыши; цитотоксическая активность; HeLa; MCF-7; *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162.

ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE PHENAZINE COMPLEX OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AURANTIACA* IN RELATION TO NORMAL AND MALIGNANT CELL LINES

E. G. VEREMEENKO^a, K. V. LIIVONCHYK^a, N. P. MAXIMOVA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: E. G. Veremeenko (veremeenkokatya@yandex.ru)

In the course of the experiment, water-soluble and fat-soluble fractions of phenazine antibiotics from the *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162 and derived on its basis producer strains capable of overproducing phenazines were obtained and analyzed. Analysis of the cytotoxic and cytostatic activity of isolated water-soluble phenazine complexes

Образец цитирования:

Веремеенко Е. Г., Леончик Е. В., Максимова Н. П. Анализ биологической активности феназинового комплекса бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* в отношении нормальных и малигнизированных клеточных линий // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 14–20.

For citation:

Veremeenko E. G., Liavonchik K. V., Maximova N. P. Analysis of the biological activity of the phenazine complex of *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* in relation to normal and malignant cell lines. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 14–20 (in Russ.).

Авторы:

Екатерина Геннадьевна Веремеенко – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Екатерина Владимировна Леончик – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – Е. Г. Веремеенко.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой генетики биологического факультета.

Authors:

Ekatsiaryna G. Veremeenko, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

veremeenkokatya@yandex.ru

Katerina V. Liavonchik, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.

katerinaleoao@gmail.com

Natalia P. Maximova, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.

nataliamaximova@yahoo.com

shows that malignant cells show much greater sensitivity to these compounds, compared to normal cells. In support of this, a microscopic analysis of samples of cultures of malignant and normal cells, subjected to treatment with various fractions of phenazine antibiotics isolated from the strains studied, was carried out. He showed that on the second day of cultivation in cultures of malignant lines, a large number of cells (from 7 to 96 %) died by apoptosis, less often necrosis, whereas in a culture of fibroblasts such a massive cytotoxic effect was not found. The cytotoxicity of liposoluble fractions is extremely high for all cell cultures studied, which may be due to the presence of DMSO and its ability to enhance the cytotoxic properties of phenazines.

Key words: solid-phase extraction; phenazine; mouse fibroblasts; cytotoxic activity; HeLa; MCF-7; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162.

В настоящее время серьезной проблемой в медицине стало появление большого количества патогенных для человека штаммов бактерий и грибов, а также типов опухолей, проявляющих множественную резистентность к используемым в медицинской практике препаратам. Это существенно осложняет лечение целого ряда заболеваний, которые еще десятилетие назад не рассматривались как трудно поддающиеся терапии. В связи с этим актуальным становится поиск новых, высокоактивных соединений, позволяющих преодолеть множественную резистентность к ряду медицинских препаратов и решить вышеназванные проблемы. Наибольшее предпочтение в решении этой задачи сегодня отдается ароматическим гетероциклическим соединениям. Установлено, что химическая структура такого типа характерна для большинства биологически активных молекул, регулирующих процессы в организмах высших эукариот. Кроме того, именно ароматические гетероциклы являются одними из наиболее токсических веществ в отношении целого ряда прокариотических и эукариотических микроорганизмов.

К ароматическим гетероциклам, синтезируемым бактериями, относятся и феназиновые антибиотики. В настоящее время известно около 6 тыс. соединений этого класса, обладающих огромным разнообразием биологического действия, что позволяет использовать данные вещества в терапии различных заболеваний, например кандидозов, малярии и др. [1].

Существенным преимуществом феназиновых соединений является то, что благодаря наличию разнообразных заместителей, связанных с ароматическим ядром, некоторые из них имеют чрезвычайно широкий спектр активностей, которые не ограничиваются только антимикробным действием, но проявляют также нейропротекторные и антиоксидантные свойства. Производные феназинов уже довольно давно активно используются в медицинской практике как противорвотные средства и нейролептики, а также в ветеринарии в качестве глистогонных препаратов [2]. В настоящее время активно ведутся работы по изучению свойств природных производных феназиновых антибиотиков, относящихся к классу так называемых сложных феназинов, у которых заместители имеют разветвленную структуру [3]. Уже известно, что феназиномицин и лавандоцианин, выделенные из штаммов *Streptomyces* sp. CL190 и *Streptomyces* sp. CL9659, проявляют высокую активность *in vivo* в отношении опухолей у грызунов, а также ярко выраженную цитотоксичность к андромидиностойчивой лейкозной клеточной линии P388 мышей [4]. У *P. aeruginosa* HRW.1-S3 обнаружены два феназиновых соединения – PDC и PCA, обладающие цитотоксической активностью в отношении клеточных линий HeLa (рак шейки матки), MCF-7 (рак груди), DU145 (рак простаты), HT29 (рак толстого кишечника) [5].

Цель настоящей работы – анализ цитотоксической и цитостатической активностей выделенных феназиновых комплексов в отношении нормальных и малигнизированных клеток.

Материалы и методика исследований

В работе использовали штамм *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 из коллекции кафедры генетики БГУ (коллекционный номер – ВКМВ-162), полученные на его основе штаммы-продуценты, способные к сверхпродукции феназинов B-162/255, B-162/55, B-162/17, B-162/255/15, B-162/2, B-162/18, клетки линии HeLa (перевиваемая линия карциномы шейки матки) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), а также фибробласты мыши (в качестве контроля).

Культивирование бактерий осуществляли в стандартных питательных средах: в питательной среде для продукции антибиотиков (ПСА), предложенной в [6], питательном бульоне (ПБ), приготовленном на основе сухого концентрата, производства ФГУП «НПО «Микроген»» (Махачкала).

Клетки культивировали во влажной атмосфере (5 % CO₂, 37 °C) в CO₂-инкубаторе (*Shellab*, США), используя для двух культур опухолей среду DMEM с глутамином, феноловым красным, с содержанием глюкозы 4,5 г/л (НПП «ПанЭко», Россия). Среда культивирования содержала 10 % эмбриональной

сыворотки теленка и антибиотик «Гентамицин» в концентрации 10 мкг/мл. Пересадку линий проводили через каждые два дня на вентилируемые матрасики объемом 25 мл (*Corning*, США). Пересадку культур осуществляли при достижении высокой плотности клеток на 1 мл раствора (более 10⁶ клеток/мл) через каждые 2 дня с разведением культуры до плотности 5 · 10⁵ клеток/мл. Для подсчета клеток использовали камеру Горяева. Пересадку клеточных культур выполняли в ламинар-боксе в стерильных условиях [7].

Твердофазная экстракция феназиновых комплексов из культуральной жидкости проводилась на колонках фирмы *Agilent SampliQ C18* (США), наполненных фенилсиликагелем (*Agilent*, США). Клетки переносились в пробирки для центрифугирования с добавлением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в конечной концентрации 10 %. Далее, при 14 000 об/мин в течение 15 мин проводили центрифугирование. В это время дважды промывали колонки 5 мл 60 % ацетонитрила и 1 % уксусной кислотой, затем дважды – 5 мл высокоочищенной деионизированной воды (MQ) и раствором 10 % ацетонитрила и 1 % уксусной кислотой. Обязательным условием было не допустить просыхания колонки. После центрифугирования супернатант собирался в новые пробирки и переносился на ранее кондиционированную колонку для твердофазной экстракции (ТФЭ) с фенилсиликагелем. Далее, феназины элюировались с ТФЭ-колонки раствором 60 % ацетонитрила и 1 % уксусной кислотой [8].

Для выделения жирорастворимых феназиновых антибиотиков из культуральной жидкости пользовались методикой, описанной в [6].

Спектрофотометрический анализ проводили с использованием спектрофотометра *NanoDrop Thermo Scientific 2000* (США). В качестве растворителя использовали 100 % метанол, а также раствор 60 % ацетонитрила и 1 % уксусной кислоты. Водорастворимые феназины перерастворяли в стерильном физиологическом растворе, а жирорастворимые – в ДМСО.

Цитотоксический эффект феназиновых комплексов определяли *in vitro* с помощью МТТ-метода (теста) [9; 10]. Оптическая плотность регистрировалась на планшетном ридере *Multiscan Ascent (ThermoLabsystems, Финляндия)*, измерения выполнялись при длине волны 570 нм, затем вычиталось измеренное фоновое поглощение при 650 нм.

Расчет препаратиндуцированной гибели клеток выполнялся по [11, формула].

Концентрация препарата, которая вызывает гибель 50 % клеток (LC₅₀), может быть рассчитана графически по дозозависимой кривой. Для вычисления LC₅₀ применяют также специальную компьютерную программу, составленную в *Excel*.

Микроскопический анализ проводили с использованием микроскопа *Zeiss Axiovert 25* (Германия).

Результаты исследований и их обсуждение

Известно, что феназиновые антибиотики обладают способностью генерировать активные формы кислорода, которые, будучи чрезвычайно реакционно-способными, представляют серьезную угрозу для клетки [12]. Влияние активных форм кислорода наиболее выражено в отношении клеток, проявляющих высокую метаболическую активность и отличающихся интенсивной пролиферацией. Обе эти характеристики присущи большинству малигнизированных клеток. В связи с этим феназиновые антибиотики являются перспективными соединениями для разработки на их основе противораковых препаратов. Однако создание таких препаратов требует детального анализа влияния феназинов на нормальные клетки организма. По нашим данным, в настоящее время результаты подобных экспериментов в специализированной литературе опубликованы не были. Благодаря разнообразию заместителей, связанных с гетероциклическим ароматическим кольцом феназинов, различные типы этих соединений могут проявлять самые различные свойства. В задачу наших исследований входил поиск таких феназиновых комплексов, которые ввиду различий в их химическом составе обладали бы максимальным цитотоксическим действием в отношении малигнизированных линий, но как можно меньше влияли на нормальные клетки.

В исследованиях проводился анализ антираковой активности 12 фракций из 7 штаммов *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*, для которых ранее были продемонстрированы выраженные отличия в антимикробной активности [13]. В качестве линий малигнизированных клеток были взяты коллекционные культуры MCF-7, HeLa. Моделью нормальных клеток служили мышинные фибробласты. Полученные результаты исследований проиллюстрированы в табл. 1–3.

Показано, что в культуральной жидкости бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* присутствуют как водорастворимые, так и жирорастворимые фракции феназиновых антибиотиков, а это дополнительно указывает на их различный химический состав и наличие в суммарном феназиновом комплексе нескольких типов антибиотиков данной группы. Микроскопический анализ образцов культур малиг-

низированных и нормальных клеток, подвергшихся обработке различными фракциями феназиновых антибиотиков, выделенных из исследуемых штаммов, показал, что на вторые сутки культивирования в культурах малигнизированных линий появляется большое количество клеток (от 7 до 96 %), погибающих путем апоптоза (реже – некроза), тогда как в культуре фибробластов такого массового цитотоксического эффекта обнаружено не было. Вместе с тем цитотоксичность жирорастворимых фракций была крайне высока и одинакова для всех исследованных культур клеток, что может быть связано с присутствием ДМСО, используемого в качестве растворителя (см. табл. 1–3). Вероятнее всего, данное соединение обладает способностью усиливать цитотоксические свойства феназинов. Кроме того, имеются литературные свидетельства о том, что ДМСО может являться токсичным для клеток и сам по себе.

Анализ полученных экспериментальных данных позволяет говорить о том, что и некоторые водорастворимые фракции проявляют выраженное цитотоксическое действие (в частности, фракции 2–4 у всех исследованных штаммов) в отношении и малигнизированных, и нормальных клеток, причем как в высоких, так и в низких концентрациях, и, следовательно, не могут быть рассмотрены в качестве основы для создания медицинских препаратов ввиду их высокой токсичности. Однако в ходе наших исследований также были обнаружены фракции из различных штаммов (например, штамм В-162/17, фракции 4, 5, 7), проявляющие цитотоксичность в отношении культур клеток MCF-7 и HeLa, но не приводящие к гибели мышинных фибробластов (контроль). Примечательно, что на культуру клеток HeLa могут оказывать цитотоксическое действие и фракции, в которых концентрация феназиновых антибиотиков относительно низка. Таким примером являются фракции 5–7 штамма В-162 (см. табл. 2). Стоит отметить, что культура клеток линии HeLa оказалась наиболее чувствительной к феназиновым комплексам из проанализированных нами культур – ее рост полностью подавляется феназиновыми комплексами, выделенными из штамма В-162/17, культивируемого на среде М9.

Таблица 1

Влияние феназиновых фракций штаммов *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*
на клеточную линию MCF-7

Table 1

Effect of phenazine fractions of *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* on the MCF-7 cell line

Номер фракции	Штамм													
	В-162/255		В-162/55		В-162		В-162/18		В-162/17		В-162/17 (на среде М9)		В-162/15	
	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г
1	–	–	27,71	57,87	19,72	63,91	53,14	64,36	38,06	91,97	12,68	48,07	52,31	95,14
2	48,98	96,56	56,69	95,89	43,56	96,55	68,31	85,87	53,24	96,97	5,26	62,14	13,14	90,28
3	38,08	91,12	23,91	94,52	40,13	94,45	63,45	59,37	53,21	87,71	17,26	43,91	41,75	96,81
4	23,16	97,45	0,89	63,04	37,47	84,64	20,67	51,37	38,49	90,15	15,38	53,3	33,31	55,02
5	7,74	73,29	6,18	46,55	18,51	83,6	10,56	32,97	14,67	53,39	13,48	26,52	17,45	78,82
6	14,37	59,72	4,32	79,45	5,51	37,13	26,76	29,65	13,52	20,93	17,05	5,5	1,31	75,6
7	14,11	38,19	13,78	42,32	5,28	60,88	28,93	65,53	9,51	59,87	42,91	77,07	0,87	–
8	38,33	27,13	17,43	11,9	6,75	35,33	25,41	35,28	44,04	15,41	26,85	40,67	4,48	13,93
9	41,68	32,86	5,93	14,5	10,44	68,33	15,67	31,37	24,37	62,86	30,54	63,56	20,20	60,69
10	11,17	50,73	–	–	7,02	32,31	–	–	42,31	67,18	47,69	73,3	–	–
11	48,98	64,95	–	–	–	–	–	–	17,89	12,7	31,38	51,9	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	4,67	56,58	12,21	53,68	–	–
ДМСО	60,48	84,85	53,18	86,62	55,60	80,92	59,09	16,73	59,59	96,69	56,91	81,97	57,12	27,74

Примечание. К – концентрация феназинов, мг/л; Г – гибель клеток, %; прочерк означает отсутствие феназинов. Феназины во фракциях от 1 до 12 растворены в физиологическом растворе.

Таблица 2

Влияние феназиновых фракций штаммов *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*
на клеточную линию HeLa

Table 2

Effect of phenazine fractions of *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* on the HeLa cell line

Номер фракции	Штамм															
	B-162/255		B-162/55		B-162		B-162/18		B-162/17		B-162/17 (на среде M9)		B-162/15		B-162/2	
	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г
1	—	—	—	—	—	—	10,97	98,36	7,29	100	8,22	100	3,65	13,36	—	—
2	55,94	30,39	—	—	78,61	100	60,79	88,54	50,2	68,52	5,19	100	74,07	100	—	—
3	80,32	100	—	—	25,38	9,1	59,23	54,55	—	—	2,09	100	41,27	91,96	—	—
4	—	—	—	—	15,16	45,72	19,74	32,09	26,81	100	9,47	100	15,97	11,68	—	—
5	16,28	100	1,02	100	1,52	100	7,00	69,72	3,78	100	9,83	100	11,9	100	16,88	100
6	2,97	100	2,06	100	0,26	64,58	10,82	100	1,47	34,9	6,94	100	1,58	37,78	—	—
7	—	—	—	—	1,72	55,1	4,46	100	7,82	100	0,93	100	—	—	—	—
8	1,05	56,1	—	—	—	—	2,55	44,69	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ДМСО	24,75	79,66	1,44	100	15,34	82,4	30,02	99,63	47,10	87,77	6,70	100	34,42	87,06	2,96	100

Таблица 3

Влияние феназиновых фракций штаммов *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*
на клеточную линию фибробластов мыши

Table 3

Effect of phenazine fractions of *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* on the mouse fibroblast cell line

Номер фракции	Штамм															
	B-162/255		B-162/55		B-162		B-162/18		B-162/17		B-162/17 (на среде M9)		B-162/15		B-162/2	
	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г
1	—	—	—	—	—	—	10,97	45,37	7,29	94,88	8,22	95,95	3,65	97,91	—	—
2	55,94	29,26	—	—	78,61	27,88	60,79	30,17	50,2	29,95	5,19	36,96	74,07	92,03	—	—
3	80,32	34,71	—	—	25,38	7,17	59,23	49,15	—	—	2,09	57,89	41,27	34,17	—	—
4	—	—	—	—	15,16	3,33	19,74	2,84	26,81	24,46	9,47	95,73	15,97	17,22	—	—
5	16,28	80,75	1,02	23,38	1,52	52,79	7,00	56,65	3,78	57,97	9,83	97,77	11,9	17,24	16,88	17,59
6	2,97	36,21	2,06	23,53	0,26	51,31	10,82	87,72	1,47	37,2	6,94	42,99	1,58	18,68	—	—
7	—	—	—	—	1,72	14,79	4,46	19,26	7,82	11,04	0,93	15,95	—	—	—	—
8	1,05	17,92	—	—	—	—	2,55	14,71	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ДМСО	24,75	85,13	1,44	88,65	15,34	87,23	30,02	85,07	47,10	86,34	6,70	94,59	34,42	77,13	2,96	91,94

Особый интерес представляет то, что аналогичные по номерам фракции из разных штаммов проявляют различную биологическую активность в отношении одной и той же клеточной культуры, причем цитотоксический эффект не всегда коррелирует с концентрацией феназиновых антибиотиков, по-видимому, он обусловлен их качественным составом. В предыдущих исследованиях было установлено, что во всех фракциях присутствует феназин-1-карбоксилат в относительно высоких концентрациях. Это соединение относится к мажорным феназинам, описанным ранее для бактерий *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*. Обнаруженные нами различные свойства фракций, предположительно, обусловлены наличием минорных феназиновых соединений, обладающих, вероятно, большей активностью, чем феназин-1-карбоксилат. На основании этого установление химического состава феназиновых фракций штаммов, продемонстрировавших наиболее положительные результаты, а также определение их оптимальной концентрации будут являться важнейшими задачами наших последующих исследований.

Библиографические ссылки

1. Mavrodi D. V., Blankenfeldt W., Thomashow L. S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. Vol. 44. P. 417–445.
2. Nicolli Bellotti de Souza, Isabel M. de Andrade, Paula F. Carneiro, et al. Blood shizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro and in mice malaria studies // *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2014. Vol. 109, № 5. P. 546–552.
3. Haas D., Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. Vol. 41. P. 117–153.
4. Mavrodi D. V., Peever T. L., Mavrodi O. V., et al. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76, № 3. P. 866–879.
5. Dasgupta D., Kumar A., Mukhopadhyay B., et al. 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. Vol. 99, № 20. P. 8653–8665.
6. Levitch M. E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains // *J. Bacteriol.* 1970. Vol. 103, № 1. P. 16–19.
7. William F. Scherer, Jerome T. Syverton. The Viral Range in Vitro of a Malignant Human Epithelial Cell (Strain HeLa, Gey) // *Am. J. Pathol.* 1954. Vol. 30, № 6. P. 1075–1083.
8. Шаниро М. А., Веремеенко Е. Г., Янцевич А. В. Оптимизация методов твердофазной экстракции феназиновой фракции из культуральной среды и клеток *Pseudomonas aeruginosa* // Биология – наука XXI века : сб. тез. XIX Междунар. школы-конференции молодых ученых (Пушино, 20–24 апр. 2015 г.). Пушино, 2015.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. Vol. 65, № 1/2. P. 55–63.
10. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay // *J. Immunol. Methods.* 1990. Vol. 130, № 1. P. 149–151.
11. Черепович В. С., Шахлевич Е. В., Антоненко Е. В. и др. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности // *Мед. журн.* 2006. № 2. С. 106–108.
12. Веремеенко Е. Г. Получение, характеристика и применение продуцентов феназиновых антибиотиков бактерий *Pseudomonas aurantiaca* : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03. Минск, 2010.
13. Леончик Е. В., Веремеенко Е. Г. Изучение антагонистической активности бактерий *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* в отношении условно-патогенных для человека и животных микроорганизмов // Сборник работ 74-й научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета (Минск, 19 апр. 2017 г.). Минск : БГУ, 2017.

References

1. Mavrodi D. V., Blankenfeldt W., Thomashow L. S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. Vol. 44. P. 417–445.
2. Nicolli Bellotti de Souza, Isabel M. de Andrade, Paula F. Carneiro, et al. Blood shizonticidal activities of phenazines and naphthoquinoidal compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro and in mice malaria studies. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2014. Vol. 109, No. 5. P. 546–552.
3. Haas D., Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. Vol. 41. P. 117–153.
4. Mavrodi D. V., Peever T. L., Mavrodi O. V., et al. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 76, No. 3. P. 866–879.
5. Dasgupta D., Kumar A., Mukhopadhyay B., et al. 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. Vol. 99, No. 20. P. 8653–8665.
6. Levitch M. E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains. *J. Bacteriol.* 1970. Vol. 103, No. 1. P. 16–19.
7. William F. Scherer, Jerome T. Syverton. The Viral Range in Vitro of a Malignant Human Epithelial Cell (Strain HeLa, Gey). *Am. J. Pathol.* 1954. Vol. 30, No. 6. P. 1075–1083.

8. Shapiro M. A., Veremeenko E. G., Yantsevich A. V. Optimization of methods for solid-phase extraction of the phenazine fraction from the culture medium and cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biology – the science of the XXI century* : the collect. of theses of the XIX Int. school of the conf. of young sci. (Pushchino, 20–24 April, 2015). Pushchino, 2015 (in Russ.).
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983. Vol. 65, No. 1/2. P. 55–63.
10. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods*. 1990. Vol. 130, No. 1. P. 149–151.
11. Cherepovich V. S., Shakhlevich E. V., Antonenko E. V., et al. Optimization of the critical parameters of the MTT test for the evaluation of cellular and drug cytotoxicity. *Med. J.* 2006. No. 2. P. 106–108 (in Russ.).
12. Veremeenko E. G. The receiving, characteristic and application of producers phenazine antibiotics of bacteria *Pseudomonas aurantiaca* : dissertatsiya... kandidata biol. nauk : 03.02.03. Minsk, 2010 (in Russ.).
13. Leonchik E. V., Veremeenko E. G. The study of the antagonistic activity of bacteria *Pseudomonas chlororaphis* sbsp. *aurantiaca* in relation to opportunistic microorganisms for humans and animals. *Collection of works of the 74th scientific conference of students and postgraduate students of the Belarusian State University* (Minsk, 19 April, 2017). Minsk : BSU, 2017.

Статья поступила в редколлегию 15.09.2017.
Received by editorial board 15.09.2017.