

УДК 577.19 : 579.22

В.Н. НИКАНДРОВ, доктор биол. наук, профессор,
профессор кафедры биотехнологии
Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Н.С. ПЫЖОВА, канд. биол. наук
старший научный сотрудник
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь,
г. Минск, Республика Беларусь

Статья поступила 7 марта 2023 г.

О СПОСОБНОСТИ СИНЕ-ЗЕЛЕННЫХ ПИГМЕНТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* РАСЩЕПЛЯТЬ БЕЛКИ

Впервые продемонстрировано ранее неизвестное свойство пиовердина и пиоцианина – способность расщеплять белки. Судя по результатам ингибиторного анализа с пиовердином и данным литературы о пиоцианине, это свойство реализуется через активные формы кислорода, прежде всего, супероксидный радикал. В отношении пиоцианина остается требующей выяснения возможность связывания его молекулой катионов металлов с переменной валентностью. Обнаруженное действие молекулярного йода и местного анестетика прокаина полностью подавлять желатин-расщепляющую способность пиоцианина (в меньшей мере бензокаина – на 36%) дает определенные основания для изыскания средств, подавляющих подобную способность пигмента, учитывая его патогенное действие. Полученные результаты о новом свойстве пиовердина и пиоцианина дополняют арсенал «инструментов» патогенности этих пигментов.

Ключевые слова: пиовердин, пиоцианин, расщепление белков, ингибиторный анализ, активные формы кислорода, фосфаты, пиридиновые нуклеотиды

NIKANDROV Vitaliy N., Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor of Biochemistry,
Professor of the Department of Biotechnology,
Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus
E-mail: nikandrov.vitaly@gmail.com.

PYZHOVA Nelly S. PhD in Biol. Sc.
RSPC of Epidemiology and Microbiologie,
Senior Researcher
Minsk, Republic of Belarus

ON THE ABILITY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA BLUE-GREEN PIGMENTS TO CLEAVAGE PROTEINS

For the first time, a previously unknown property of pyoverdin and pyocyanin – the ability to cleavage proteins, has been demonstrated. Judging by the results of inhibitory analysis with pyoverdin and literature data on pyocyanin, this property is realized through reactive oxygen species, primarily the superoxide radical. In relation to pyocyanin, the possibility of binding of metal cations with variable valence by pyocyanin molecule remains to be clarified. The discovered effect of molecular iodine and the local anes-

thetic procaine to completely suppress the gelatin-cleaving ability of pyocyanin (to a lesser extent benzocaine – by 36%) gives certain grounds for finding means to suppress this ability of the pigment, given its pathogenic effect. The obtained results on the new property of pyoverdine and pyocyanin complement the arsenal of "tools" for the pathogenicity of these pigments.

Keywords: *pyoverdine, pyocyanin, protein cleavage, inhibitory assay, reactive oxygen species, phosphates, pyridine nucleotides.*

Введение. На протяжении пяти десятилетий условно-патогенный микроорганизм *Pseudomonas aeruginosa* составляет одну из проблем клинической медицины. Микроорганизм вызывает тяжелые внутрибольничные инфекции – от интоксикаций до обширных гнойно-воспалительных процессов и септического шока, инфекции опасные для жизни у лиц с ослабленным иммунитетом, хронические инфекции у больных муковисцидозом [1–3].

В 2017 г. ВОЗ классифицировала *Ps. aeruginosa* как критический агент, угрожающий здоровью человека и обуславливающий необходимость срочной разработки новых методов лечения [4]. Между тем, характерной особенностью *Ps. aeruginosa* является ее нечувствительность ко многим антибактериальным препаратам. Так, клинические штаммы *Ps. aeruginosa* часто обладают значительной резистентностью к беталактамам, аминогликозидам, цефалоспорином и фторхинолонам, что делает ее эрадикацию чрезвычайно трудной [5]. В силу этого, при хроническом инфекционном бронхолегочном процессе, вызванном *Ps. aeruginosa*, практически невозможно полностью удалить ее из дыхательных путей [6].

Патогенные свойства *Ps. aeruginosa* обусловлены богатым арсеналом факторов патогенности, включающем протеиназы, гидроцианид, гемолитические фосфолипазу С и рамнолипид, а также энтеротоксин, экзотоксин А (по механизму действия близкий дифтерийному токсину), летальный токсин, пигменты (прежде всего, пиоцианин и пиовердин), контактные токсины: ExoS, ExoT, ExoU, ExoY и другие [2, 4, 7–9].

Было установлено повреждающее действие сине-зеленых пигментов – пиовердина и пиоцианина на клетки эпителия, эндотелия, лейкоцитов, снижение уровня глутатиона в эритроцитах [цит. по 10]. Нашими исследованиями было показано, что эти пигменты

вызывают терморезистентный гемолиз эритроцитов (в отличие от термоинактивируемой фосфолипазы), а также расщепление лецитина яйца в тонком слое агарового геля [11, 12].

Эти пигменты – низкомолекулярные соединения. В состав зелено-желтого пиовердина входят олигопептидная цепь, содержащая β-гидроксиаспартат, серин, треонин и лизин в молярном отношении 2:2:2:1, 2,3-диамино-6,7-дигидроксихинолиновый хромофор (рис. 1). Молекулярная масса пиовердина соответствует 1,2 кДа [13].

Ярко-синий пиоцианин же представляет собой цвиттер-ион феназинового типа (рис. 2) молекулярной массы 0,21 кДа [15].

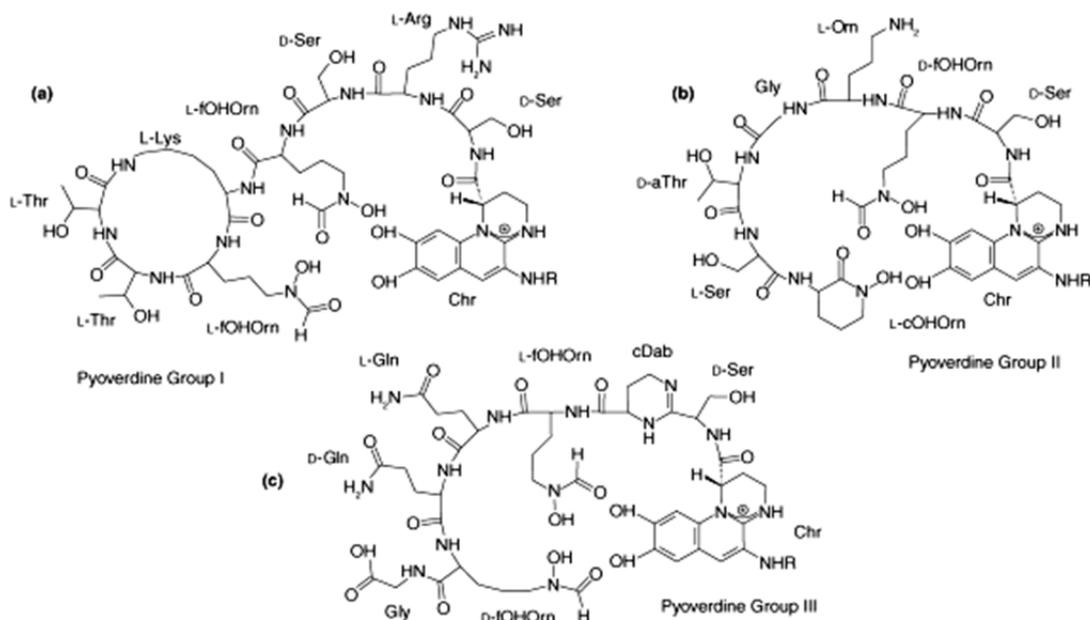
Как упомянуто выше по тексту, ранее нами было впервые продемонстрирована гемолитическая способность пиовердина-пиоцианина. Более того, оказалось, что эти пигменты, по-видимому, разрушают фосфолипидный компонент мембран эритроцитов [12].

В этой связи логически стал вопрос о возможности такого разрушения данными пигментами и белков.

Цель настоящей работы – выявить возможность разрушения белков пиовердином и пиоцианином.

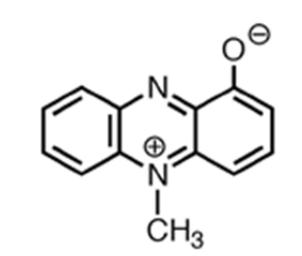
Материалы и методы. В работе использовали сефадексы G-25 fine и G-15 (Pharmacia, Швеция), диизопротилфторфосфат (DFP), бактоагар типа «Difco» (Ferak, Германия), азид натрия, желатин (Serva, Германия), нитротетразолиевый синий (NBT), D-маннит, *p*-хлормеркурибензоат (PCMB) (Chemapol, Чехия), EDTA, DL-гистидин, DL-триптофан (Reanal, Венгрия).

Фибриноген и тромбин человека были изготовлены производством РНПЦ гематологии и трансфузиологии Минздрава Республики Беларусь, казеин по Гаммерстену, а также другие реактивы квалификации «хч» или «чда» были производства стран СНГ,



Рисунек 1. – Три вида пиовердина *Pseudomonas aeruginosa*: пиовердин группы I (а), пиовердин группы II (б), пиовердин группы III (с).

Обозначения: aThr – алло-треонин; cDab – тетрагидропиримидиновое кольцо, образованное конденсацией Dab с предшествующей аминокислотой; Chr – хромофор, L-cOHOrn – циклический N5-гидроксиорнитин; Dab – 2,4-диаминобутират; L-fOHOrn – N5-формил-N5-гидроксиорнитин [14]



Рисунек 2. – Структура пиоцианина [16]

их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Штаммы, выделенные из клинического материала, любезно предоставлены сотрудниками лаборатории внутрибольничных инфекций ЦНИЛ Белгосмедуниверситета.

Образцы культуральной жидкости *Ps.aeruginosa* получены и предоставлены для исследований А.Э. Пыж. Микроорганизм культивировали в колбах с мясо-пептонным бульоном при 37°C на термостатируемой качалке в течение 48 ч при скорости перемешивания 180 об/мин. Биомассу отделяли центрифугированием.

Протеолитическую активность определяли по лизису фибриногена, казеина, тромбина, сывороточного альбумина, гемоглобина

или желатина в тонком слое агарового геля как подробно описано нами ранее [17]. Концентрация белков составляла 10 г/л, агар-агара – 10 г/л. В качестве растворителя для приготовления пластин использовали 0,15 М NaCl, содержащий 0,01 М фосфатный буфер pH 7,4, или 0,05 М трис-HCl буфер. Пластины с нанесенными пробами инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 2 н. трихлоруксусной кислотой.

Все исследования выполнены не менее чем 3-кратно. Результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Учитывая, что синтезируемые штаммами *Ps.aeruginosa* че-

тыре протеиназы характеризуются молекулярными массами в диапазоне 17–56 кДа и, в ряде случаев, способны образовывать агрегаты значительно большей массы [18–21], для хроматографического выделения пигментов был использованы сефадексы G-25 и G-15, позволяющие разделять пептиды и белки мол. массой от 1 до 5 и до 1,5 кДа соответственно [22].

Хроматография компонентов супернатантов культуральной жидкости двух штаммов микроорганизма на колонках с сефадексом G-25 (fine), уравновешенной 0,15 М раство-

ром NaCl pH 7,5, при элюции этим же раствором позволила отделить во фракции с молекулярной массой выше 5 кДа основную протеолитическую активность, соответствующую протеиназам (рис. 3б).

Исходная культуральная жидкость штамма *Ps.aeruginosa* 23/2 гоб1 расщепляла желатин, фибриноген, сывороточный альбумин, казеин и гемоглобин: размер зон лизиса в убывающем порядке составлял ($n=3$) $710,2 \pm 10,3$, $376,4 \pm 18,7$, $364,6 \pm 22,0$, $170,0 \pm 12,2$, и $110,3 \pm 8,6$ мм² соответственно.

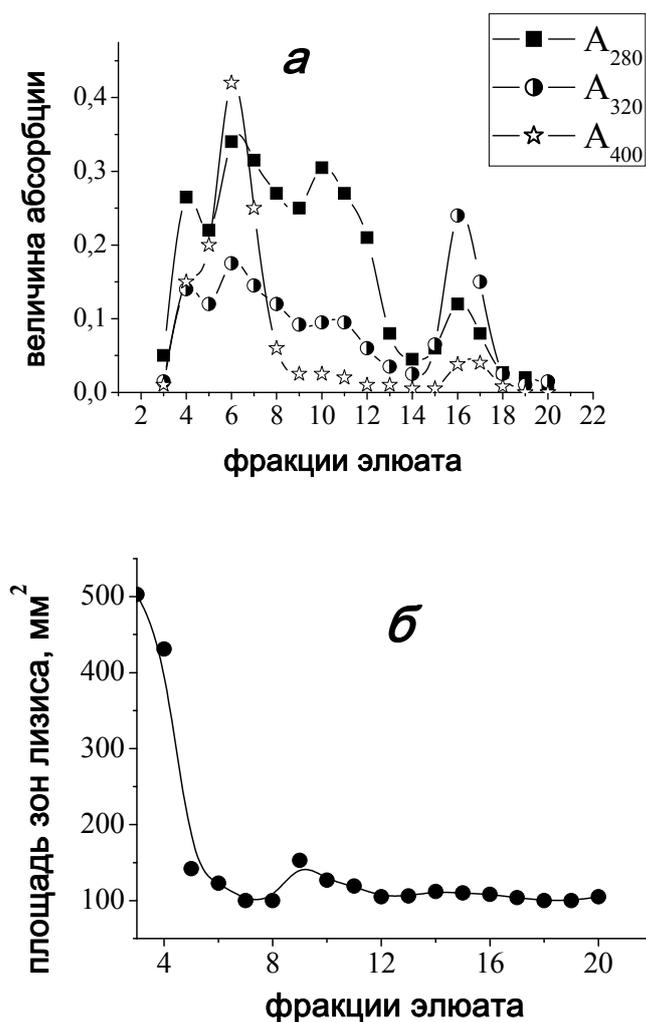


Рисунок 3. – Фракционирование культуральной жидкости штамма 23/2гоб1 *Pseudomonas aeruginosa* на колонке с сефадексом G-25

(а – профиль элюции по абсорбции при 400, 320, 282 нм; б – профиль элюции по желатинолитической активности фракций; проба предварительно разведена дистиллированной водой в 13,5 раз, колонка размером 25×0,9 см, элюция 0,15 М раствором NaCl; объем образца – 1 мл, объем фракций – 3 мл)

После выхода протеиназ практически в свободном объеме бесцветной жидкости в «шлейфе» элюата достаточно демонстративно определялась некая протеолитическая активность (рис. 3б). В частности, величина желатинолитической активности этих фракций не превышала $105\text{--}150\text{ мм}^2$

Судя по особенностям абсорбции пиовердина (экстремумы при 320 и 400 нм) и пиоцианина (экстремум при 282 нм) [12,15,16], при хроматографии не получено четкого разделения этих двух пигментов, несмотря на значительную разницу молекулярных масс (рис. 3а). Характер хроматографической кривой свидетельствует о гетерогенности

пиовердина, что соответствует данным литературы [23].

Не удалось достичь разделения двух пигментов и при хроматографии на сефадексе G-15 (рис. 4).

В дальнейшем пиоцианин удалось выделить иным способом (см. ниже по тексту).

В низкомолекулярных фракциях, используемых для исследований, несмотря на выраженный зелено-желтый цвет, нельзя исключить присутствие примеси пиоцианина. Поэтому только условно их мы называем «пиовердин».

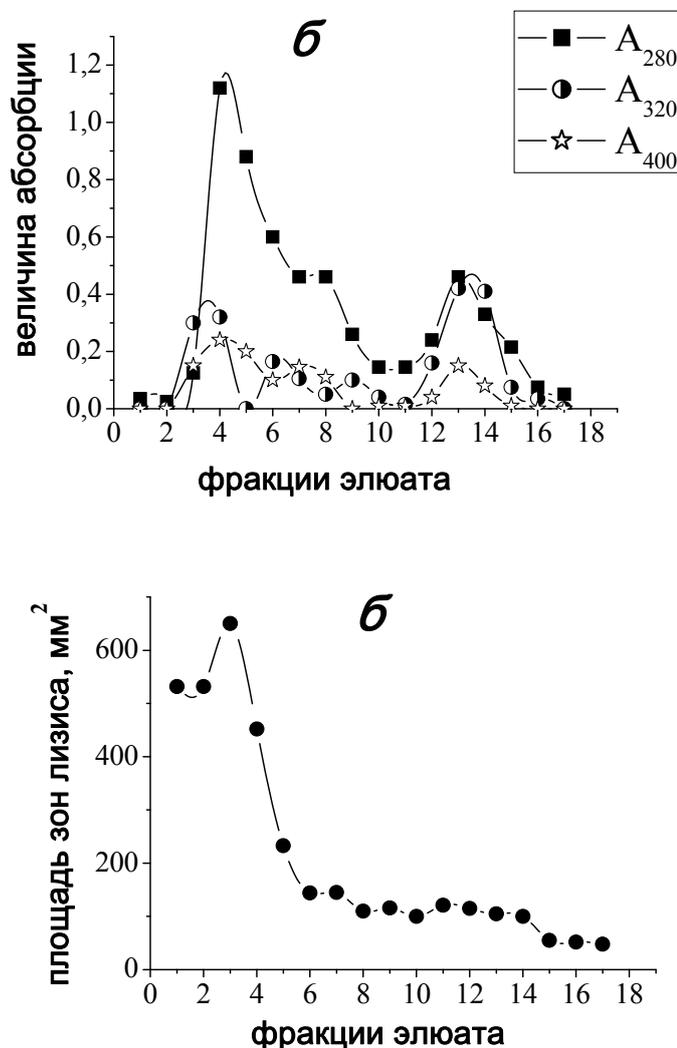


Рисунок 4. – Фракционирование культуральной жидкости штамма 23/2Гоб1 *Pseudomonas aeruginosa* на колонке с сефадексом G-15 (условия и обозначения те же, что в рис. 3)

Поскольку фракции, например №№ 16 и 17 рис. 3, содержат лишь низкомолекулярные компоненты, логически стал вопрос о природе способности «пиовердина» расщеплять белок.

Между тем, полученные образцы «пиовердина» расщепляли сывороточный альбумин, желатин, фибриноген и тромбин человека, казеин и гемоглобин ($n=3$): $150,2 \pm 16,7$, $116,4 \pm 15,0$, $124,8 \pm 10,8$, $117,0 \pm 9,2$ и $170,1 \pm 12,6$ мм² зон лизиса соответственно. При этом различия в величине расщепления составляют 31,6%, что существенно отличается от такового культуральной жидкости (см. выше по тексту): 6,44 раза. Это позволяет считать, что для расщепления пигментами структурные особенности белков имеют гораздо меньшее значение, чем для расщепления протеиназами.

Ранее нами было показано, что расщепление пептидных связей в белках при отсутствии протеиназ (да и при их действии) осуществляется с участием активных форм кислорода и, прежде всего, супероксидного радикала [24–27]. Роль супероксидного радикала в расщеплении пептидных связей в белках была продемонстрирована и в модельных экспериментах [28].

Известно, что пиовердин в силу своих сидерофорных свойств связывает ионы железа со стехиометрией 1:1 [16], что принципиально создает условия для генерирования активных форм кислорода. В силу этого было изучено действие ряда перехватчиков активных

форм кислорода и группоспецифических ингибиторов протеиназ на расщепление образцами пиовердина желатина.

В целом, перехватчики синглетного кислорода и HO[•]-радикала существенного действия на расщепление желатина пиовердином не оказали. Исключение составил лишь азид натрия, вызвавший угнетение процесса на 23%, что может быть обусловлено не сколько перехватом синглетного кислорода, сколько взаимодействием с катионом железа в составе молекулы пигмента. Сильное подавление расщепления белка пиовердином – на 69% – наблюдали в присутствии перехватчика супероксидного радикала – нитротетразолиевого синего. Комплексоны – ЭДТА и *o*-фенантролин полностью блокировали расщепление желатина вследствие взаимодействия с катионом железа в его молекуле. Представляется достаточно понятным полное угнетение расщепления желатина и диизопропилфторфосфатом, учитывая наличие в структуре пиовердина остатков серина и треонина. Несколько неожиданным явилось подавление процесса *p*-хлормеркурибензоатом на 48%, поскольку в его структуре SH-группы отсутствуют.

В максимальных использованных концентрациях ортофосфат натрия вызвал угнетение расщепления желатина на 19,6 и 29,1%, а пирофосфат натрия и аденозинтрифосфат в использованных концентрациях существенного влияния не оказали (таблица 2).

Таблица 1. – Влияние эффекторов (10^{-3} М) на расщепление желатина при pH 7,5 (мм² зон лизиса) фракций «пиовердина» госпитального штамма *Pseudomonas aeruginosa* 23/22061 ($n = 4$)

Эффектор	Размер зон расщепления	Эффектор	Размер зон расщепления
Контроль, без добавок	$131,7 \pm 9,0$	+ нитротетразолиевый синий	$40,3 \pm 5,2^*$
+ азид натрия	$100,8 \pm 8,3^*$	+ ЭДТА	0*
+ гистидин	$126,5 \pm 8,6$	+ <i>p</i> -хлормеркурибен-зоат	$68,0 \pm 4,1^*$
+ триптофан	$125,0 \pm 7,3$	+ <i>o</i> -фенантролин	0*
+ этанол (50%)	$140,1 \pm 14,4$	+ диизопропилфтор-фосфат	0*
+ маннит	$113,2 \pm 10,2^*$		
+ формиат натрия	$124,2 \pm 11,4$		
+ тиомочевина	$144,0 \pm 13,1$		

Примечание – Здесь и далее: * – изменения статистически достоверные при $P \leq 0,05$; эффекторы добавлены в желатин-гелевую платину, 0,05 М трис-HCl буфер

Таблица 2. – Расщепление желатина (мм² зон лизиса) в тонком слое агарового геля образцами пиовердина в присутствии биогенных фосфатов и пиридиновых нуклеотидов (n=3)

Эффектор, концентрация	Размер зон расщепления	Эффектор, концентрация	Размер зон расщепления
Контроль	210,0 ± 18,0	Контроль	121,2 ± 8,2
+ ортофосфат натрия:		+ АТР:	
0,03 М	169,0 ± 14,3*	0,001 М	110,8 ± 7,9
0,015 М	148,8 ± 9,9*	0,0001 М	141,0 ± 9,6
0,0075 М	208,8 ± 17,5		
0,0038 М	228,0 ± 16,5	Контроль	191,3 ± 13,6
0,0019 М	210,3 ± 12,4	+ NAD, 0,001М	105,9 ± 8,5 *
+ пирофосфат натрия		+ NADH, 0,001М	162,8 ± 11,7 *
0,001 М	203,0 ± 16,7		

Учитывая роль сине-зеленых пигментов как факторов патогенности псевдомонад, изучено действие отдельных фармацевтических препаратов на расщепление белков пиовердином и пиоцианином.

Добавление резорцина (10⁻³ М) или лизоцима (10⁻⁵ М) принципиального действия на расщепление желатина пиовердином не оказало (не показано).

Пиоцианин был выделен нами из культуральной жидкости методом диализа ее (не более 30 мин) через целлофановую мембрану против двойного объема дистиллированной воды. При этом диализат окрашивался в ярко-синий цвет. Абсорбция диализата при 320 нм практически не определялась, что дает основания считать отсутствие в нем пиовердина.

Полученные таким образом образцы пиоцианина из пула культуральной жидкости штаммов псевдомонад 74/5гоб3, 74/5гоб4 и

23/2гоб1 проявляли способность расщеплять желатин с образованием зон лизиса (n = 3) 331,8 ± 12,6 мм². Примечательно, что таковая активность полученных образцов не снижалась после хранения при 8 °С в течение 7 суток и даже после замораживания/оттаивания.

В отличие от пиовердина, добавление ортофосфата (но не пирофосфата) натрия сопровождалось нарастанием расщепления желатина на 64% (таблица 3).

Молекулярный йод полностью подавлял расщепление белка. Таким же действием обладал прокаин, а бензокаин уменьшал белок-расщепляющую способность пиоцианина лишь на 36%. Возможно, введение в боковую цепь молекулы прокаина более сложных заместителей (диэтиламино-) существенно усиливает ингибиторное его действие в сравнении с бензокаином. Это сам по себе интересный факт, но здесь необходимы дальнейшие обстоятельные исследования.

Таблица 3. – Влияние эффекторов на расщепление желатина при pH 7,5 (мм² зон лизиса) пиоцианином госпитального штамма *Pseudomonas aeruginosa* 23/2гоб1 (n = 4)

Эффектор, концентрация	Размер зон расщепления	Эффектор, концентрация	Размер зон расщепления
Контроль	309,5 ± 11,4	+ NAD, 0,001М	204,3 ± 14,6*
+ 0,006 М ортофосфат натрия	504,5 ± 17,2*	+ NADH, 0,001М	216,7 ± 12,5 *
+ 0,005 М пирофосфат натрия	340,5 ± 15,0	+ NADP, 0,001М	157,8 ± 11,7 *
+ I ₂ , 0,055 М (раствор в этаноле) ^a	0*	+ NADPH, 0,001М	377,6 ± 18,8*
+ прокаин, 0,021 М	0*	+ никотиновая кислота, 0,01 М	0*
+ бензокаин, 0,0061 М	199,3 ± 12,1*	+ KMnO ₄ , 0,01 М	250,7 ± 14,7
		+ CuSO ₄ , 0,002 М ^a	0*
		+ ZnSO ₄ , 0,002 М ^a	0*

Примечание – a – раствор эффектора добавляли к образцу пиоцианина

Хорошо известно, что пиоцианин проявляет редокс-свойства и вызывает накопление активных форм кислорода, особенно $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 [29,30]. Эта способность является, пожалуй, одним из основных механизмов патогенного действия пигмента и его антимикробной и фунгицидной активности.

В концентрации 10^{-3} М пиридиновые нуклеотиды (за исключением NADPH) снижали способность пиоцианина расщеплять желатин на 30–49%, тогда как NADPH увеличил ее на 22%. Кстати, пиоцианин способен восстанавливаться этим нуклеотидом [29, 31]. Такое же восстановление может оказывать и NADH [29,31], однако этот нуклеотид подавлял расщепление желатина на 34%.

Никотиновая кислота, а также сульфаты меди (II) и цинка полностью блокировали желатин-расщепляющую способность пигмента. Однако достаточно сильный окислитель – перманганат калия даже в концентрации 10^{-2} М вызвал угнетение этой способности лишь на 19%.

Здесь закономерно возникает вопрос: каким образом таковая способность пиоцианина реализуется. Если свойство пиовердина связывать ионы железа и некоторых других металлов известно хорошо [например, 23], то о пиоцианине таких сведений в литературе нет. Между тем, совершенно не исключено, что феназиновый цвиттер-ион пиоцианина также способен связывать катионы металлов переменной валентности, что и дает ему способность расщеплять белки аналогично пиовердину.

Подтверждением этого предположения, в какой-то мере, является тот факт, что при добавлении к образцу пиоцианина ЭДТА в концентрации 10^{-3} М обнаружено снижение желатин-расщепляющей способности пигмента на 50%: в контроле $289,2 \pm 10,4$, в опыте – $146,7 \pm 9,8$ мм². Однако детальное прояснение этого предположения требует проведения дальнейших исследований.

Заключение. Изложенные материалы впервые демонстрируют ранее неизвестное новое свойство пиовердина и пиоцианина – способность расщеплять белки. Судя по результатам ингибиторного анализа с пиовердином и данными литературы о пиоцианине, это свойство реализуется через активные формы кислорода, прежде всего, суперок-

сидный радикал. Аналогичная картина проявлялась и в гемолитической активности пигментов: она полностью подавлялась в присутствии перехватчика $O_2^{\cdot-}$ -радикала – нитротетразолиевого синего [12]. В отношении пиоцианина остается требующей выяснения возможность связывания его молекулой катионов металлов с переменной валентностью.

Ранее нами было также показано, что фракции сине-зеленых пигментов госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* подавляли плазминоген-активаторную способность урокиназы на 55–67%, стрептокиназы – на 35–60% , а также каталитическую активность трипсина, α -химотрипсина, субтилизина, папаина и металлопротеиназы *Bac. megaterium* на 20–69% [11]. Является ли этот эффект следствием «структурного» ингибирования молекул энзимов или же опять-таки он опосредован активными формами кислорода – отдельная задача исследований в перспективе.

Обнаруженное действие молекулярного йода и местного анестетика прокаина (в меньшей мере бензокаина) на расщепление желатина пиоцианином, по нашему мнению, дает основания для изыскания средств, подавляющих подобную способность пигмента, учитывая его патогенное действие.

Тем не менее, полученные результаты о новом свойстве пиовердина и пиоцианина, на наш взгляд, дополняют арсенал «инструментов» патогенности этих пигментов.

*Авторы выражают искреннюю благодарность кандидату мед. наук, доценту Г.А. Скороходу за предоставление госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и кандидату биол. наук А.Э. Пыж за предоставление образцов культуральной жидкости.*

Список литературы

1. Khalifa, A. B. H. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de regulations / A.B.H. Khalifa, D. Moissenet, H.V. Thien, M. Khedher // Ann Biol Clin. – 2011. – Vol. 69. – No 4. – P. 393-403.
2. Лазарева, А. В. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология / А. В. Лазарева [и др.] // Клини. микробиол. ан-

- тимикроб. химиотер. – 2015. – Т. 17. – № 3/ – С. 170-186.
3. Javanmardia, F. A systematic review and meta-analysis on exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates / F. Javanmardia, A. Emamia, N. Pirbonyeha, A. Keshavarzib, M. Rajaeae // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2019. – Vol. 75. – P. 1-10 104037. /doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104037.
 4. Sauvage, S. Exoproteomics for better understanding *Pseudomonas aeruginosa* virulence / S. Sauvage, J. Hardouin // *Toxins*. – 2020. – Vol. 12, No 9. – 571. doi:10.3390/toxins12090571
 5. Благовидов, Д. А. Синегнойная инфекция у больных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких и проблемы ее вакцинопрофилактики / Д. А. Благовидов, О.И. Симонова, М.П. Костинов, И.Е. Смирнов // *Российский педиатрический журнал*. – 2015. – Т. 18 № 6. – С. 54–60.
 6. Симонова, О. И. Решение проблемы хронической синегнойной инфекции у детей с муковисцидозом / О. И. Симонова [и др.] // *Вопросы современной педиатрии*. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 66–73
 7. Döring, G. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* / G. Döring, M. Maier, E. Müller, Z. Bibi, B. Tümmler, A. Kharazmic // *Antibiot. Chemother.* – 1987 – Vol. 39. – P. 136-148.
 8. Sadikot, R. T. Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia / R. T. Sadikot, T. S. Blackwell, J. W. Christman, Al. S. Prince // *Am. J. Respiratory and Critical Care Med.* – 2005. – Vol. 171. – P. 1209–1223.
 9. E.Reboud, E. Exolysin shapes the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clonal outliers / E. Reboud, P. Basso, A. P. Maillard, P. Huber, I. Attrée // *Toxins*. – 2017. – Vol. 9, No 11. – 364. doi:10.3390/toxins9110364
 10. Пыж, А.Э. Синие-зеленые пигменты *Pseudomonas aeruginosa* и их значение в патогенности микроорганизма / А. Э. Пыж, В. Н. Никандров // *Здравоохранение*. – 2008. – № 11. – С. 41–45.
 11. Никандров, В. Н. Молекулярные основы патогенности госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*: новые функциональные свойства синие-зеленых пигментов / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, А. Э. Пыж // «Совершенствование осуществления государственного санитарного надзора в Республике Беларусь. Материалы XI съезда гигиенистов и эпидемиологов Республики Беларусь». Минск. –2007. – С. 205-211.
 12. Пыж, А. Э. Вклад синие-зеленых пигментов *Pseudomonas aeruginosa* в гемолитическую активность культуральной жидкости / А. Э. Пыж, В. Н. Никандров // *Журнал микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* – 2011. – № 1. – С. 19–25.
 13. Cody, Y. S. Characterization of pyoverdins (PSS), the fluorescent siderophore produced by *P. syringae* pv. / Y.S. Cody, D.S. Gross // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1987. – Vol. 53, No 5. – P. 928-934.
 14. Visca, P. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance / P. Visca, F. Imperi, I.L. Lamont // *Trends in Microbiology*. – 2006. – Vol. 15, No.1. – P. 22-30
 15. Watson, D. Purification and structural analysis of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine / D. Watson, J. MacDermot, R. Wilson, P. J. Cole, G.W. Taylor // *Eur. J. Biochem.* – 1986. – Vol. 159. – P. 309-311.
 16. Hoegy, F. Pyoverdine and pyochelin measurements / F. Hoegy, G. L. A Mislin, I. J. Schalk // *Methods Mol.Biol.* – 2014. – Vol. 1149. – P. 293-301. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0_24
 17. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. – Минск : Выш. шк., 2013. – С. 132–157.
 18. Бродина, Н.С. Характеристика, выделение и роль в инфекционном процессе протеазы *Pseudomonas aeruginosa* / Н.С. Бродина, А.Ф. Мороз, Т.Я. Лучина // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 1983. – Т. 27. – № 1. – С. 69–76.
 19. Caballero, A. R. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases /A. R. Caballero, J. M. Moreau, L. S. Engel, M. E. Marquart, J. M. Hill, R. J. O’Callaghan // *Anal. Biochemistry*. – 2001. – Vol. 290. – P. 330–337.
 20. Traidej, M. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV expressed in *Pseudomonas putida* / M. Traidej, A. R. Ca-

- ballero, M. E. Marquart, B.A. Thibodeaux, R.J. O'Callaghan // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2003. – Vol. 44, No 1. – P. 190–196. doi: 10.1167/iovs.02-0458.
21. Marquart, M. E. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions / M. E. Marquart, A. R. Caballero, M. Chomnawang, B. A. Thibodeaux, S.S. Twining, R. J. O'Callaghan // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – Vol. 46, No. 10. – P. 3761–3768. doi: 10.1167/iovs.04-1483
22. Детерман Г. Гель-хроматография. Пер. с нем. – М., Мир. – 1970. – 252 с.
23. Meyer, J-M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species // Arch. Microbiol. – 2000. – Vol. 174. – P. 135–142. doi: 10.1007/s002030000188
24. Nikandrov, V.N. Oxygen-dependent processes of proteolysis // 14th International Congress of Biochemistry, Abstracts.” Prague, 1988, vol, 1, p. 60.
25. Nikandrov, V. N. On the plasminogen-activating function of streptokinase / V. N. Nikandrov // Intern. J. Biochem. Vol. 24. – № 1, 1992. p 47-53.
26. Никандров, В. Н. Кислородзависимый путь активации плазминогена и новые физико-химические механизмы протеолиза / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Известия НАН Беларуси, сер. медико-биол. наук, 2001. – № 1. – С. 54-60.
27. Nikandrov, V. N. Some unusual manifestation of proteolysis / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // Cellular and Molecular Biology, 2006. – Vol. 52. – № 4. – p. 30-39.
28. Dean, R. T. Fragmentation of extracellular and intracellular polypeptides of free radicals / R. T. Dean, C. R. Roberts, W. Jessup // Progr. Clin. Biol. Res. 1985. – Vol. 180. – P. 341-350.
29. Hall, S. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* / S. Hall, C. McDermott, S. Anoopkumar-Dukie, A.J. McFarland, A. Forbes, A.V. Perkins, A.K. Davey, R. Chess-Williams, M.J. Kiefel, D. Arora, G.D. Grant // Toxins. – 2016. – Vol. 8. – No 8. – 236. doi:10.3390/toxins8080236
30. Gonçalves, Th. Colour me blue: the history and the biotechnological potential of pyocyanin / Th. Gonçalves, U. Vasconcelos // Molecules, – 2021. – Vol. 26. – No 927. – P. 1–18.
31. Lau, G. W. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection / G. W. Lau, D. J. Hassett, H. Ran, F. Kong // TRENDS in Molecular Medicine. – 2004. – Vol.10, No.12. – P. 599–606.

References

1. Khalifa A.B.H., Moissenet D., Thien H.V., Khedher M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de regulations. Ann Biol Clin. 2011. – Vol. 69, no 4, pp. 393-403.
2. Lazareva A.V., Chebotar' I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar' V.I., Mayanskij N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: patogennost', patogenez i patologiya [*Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy], 2015, vol. 17, no. 3, pp. 170–186. (In Russian)
3. Javanmardia F., Emamia A., Pirbonyeha N., Keshavarzib A., Rajaeaa M. A systematic review and meta-analysis on exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Infection, Genetics and Evolution. 2019, vol. 75, pp. 1-10 104037. /doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104037.
4. Sauvage S., Hardouin J. Exoproteomics for better understanding *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Toxins. 2020. Vol. 12, No 9. 571. doi:10.3390/toxins12090571
5. Blagovidov D.A., Simonova O.I., Kostinov M.P., Smirnov I.E. Cinegnojnaya infekciya u bol'nyh s hronicheskimi nespecificheskimi zbolevaniyami legkih i problemy ee vakcinoprofilaktiki [*Pseudomonas* infections in patients with chronic nonspecific pulmonary diseases and problems of its vaccine prevention]. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal* [Russian Pediatric Journal], 2015, vol. 18, no. 6, pp. 54–60. (In Russian)
6. Simonova O.I., Gorinova Yu.V., Lazareva A.V., Katosova L.K., Burkina N.I., Chernovich V.P. Reshenie problemy hronicheskoy sinegnojnoj infekcii u detej s mukoviscidozom [Solution of the problem of pseudomonas infection in children with cystic fibrosis]. *Voprosy sovremennoj pediatrii* [Current Pediatrics], 2014, vol. 13, no. 1, pp. 66–

73. (In Russian).
<https://doi.org/10.15690/vsp.v13i1.913>
7. Döring G., Maier M., Müller E., Bibi Z., Tümmler B., Kharazmic A. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot. Chemother.* 1987 Vol. 39, pp. 136-148.
8. Sadikot R.T., Blackwell T.S., Christman J.W., Prince A.L.S. Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respiratory and Critical Care Med.* 2005. Vol. 171, pp. 1209–1223.
9. E.Reboud E., Basso P., Maillard A.P., Huber P., Attrée I. Exolysin shapes the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clonal outliers. *Toxins.* 2017. Vol. 9, no 11, 364 p. doi:10.3390/toxins9110364
10. Pyzh A.E., Nikandrov V.N. Sine-zelenye pigmenty *Pseudomonas aeruginosa* i ih znachenie v patogennosti mikroorganizma [Significance of blue-green pigments of *Pseudomonas aeruginosa* for microorganism pathogenicity]. *Zdravoohranenie [Healthcare]*, 2008, no. 11, pp. 41–45. (In Russian)
11. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S., Pyzh A.E. Molekulyarnye osnovy patogennosti hospital'nyh shtammov *Pseudomonas aeruginosa*: novye funktsional'nye svoystva sine-zelenykh pigmentov [Molecular basis of pathogenicity of hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*: new functional properties of blue-green pigments]. *Sovershenstvovanie osushchestvleniya gosudarstvennogo sanitarnogo nadzora v Respublike Belarus': materialy XI s"ezda gigienistov i epidemiologov Respubliki Belarus'*. Ed. Rimzha M.I. et.al. Minsk, 2007, pp. 205–211. (In Russian)
12. Pyzh A.E., Nikandrov V.N. Vklad sine-zelenykh pigmentov *Pseudomonas aeruginosa* v gemoliticheskuyu aktivnost' kul'tural'noj zhidkosti [Contribution of blue-green pigments to hemolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* cultural fluid]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of. Microbiology, Epidemiology and Immunobiology], 2011, no. 1, pp. 19–25. (In Russian)
13. Cody Y.S., Gross D.S. Characterization of pyoverdins (PSS), the fluorescent siderophore produced by *P. syringae* pv. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, vol. 53, no 5, pp. 928-934.
14. Visca P., Imperi F., Lamont I.L. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology.* 2006. Vol. 15, no.1, pp. 22-30
15. Watson D., MacDermot J., R. Wilson, P.J. Cole, Taylor P G.W. Purification and structural analysis of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine. *Eur. J. Biochem.* 1986. – Vol. 159, pp. 309-311.
16. Hoegy F., Mislin G.L.A, Schalk I.J. Pyoverdine and pyochelin measurements. *Methods Mol.Biol.* 2014. Vol. 1149, pp. 293-301. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0_24
17. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Metody isledovaniya proteoliza. Glava 5. [Methods for the study of proteolysis. Chapter 5]. *Sovremennyye problemy biokhimii. Metody isledovaniy [Modern problems of biochemistry. Research methods]*. Minsk: Visheyschaya shkola, 2013, pp. 132-157. (In Russian)
18. Brodinova N.S., Moroz A.F., Luchina T.Ya. Harakteristika, vydelenie i rol' v infektsionnom processe proteazy *Pseudomonas aeruginosa* [Characteristics, isolation and role in the infectious process of *Pseudomonas aeruginosa* protease]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of. Microbiology, Epidemiology and Immunobiology], 1983, vol. 27, no. 1, pp. 69–76. (In Russian)
19. Caballero A.R., Moreau J.M., Engel L.S., Marquart M.E., Hill J.M., O'Callaghan R.J. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal. Biochemistry.* 2001. Vol. 290, pp. 330–337.
20. Traidej M., Caballero A.R., Marquart M.E., Thibodeaux B.A., O'Callaghan R.J. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV expressed in *Pseudomonas putida*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003. Vol. 44, no 1, pp. 190–196. doi: 10.1167/iovs.02-0458.
21. Marquart M.E., Caballero A.R., Chomnawang M., Thibodeaux B.A., Twining S.S., O'Callaghan R.J. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005. Vol. 46, no. 10, pp. 3761–3768. doi: 10.1167/iovs.04-1483
22. Determan G. *Gel'-hromatografiya* [Gel chromatography]. Moscow, Mir, 1970, 252 p. (In Russian)
23. Meyer J-M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of

- fluorescent *Pseudomonas* species Arch. Microbiol. 2000. Vol. 174, pp. 135–142. doi: 10.1007/s002030000188
24. Nikandrov V.N. Oxygen-dependent processes of proteolysis. 14th International Congress of Biochemistry, Abstracts.” Prague, 1988, vol, 1, p. 60.
25. Nikandrov V.N. On the plasminogen-activating function of streptokinase . Intern. J. Biochem. Vol. 24, no. 1, 1992. p 47-53.
26. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Kislordzavisimyy put aktivatsii plazminogena i novyye fiziko-himicheskie mehanizmyi proteoliza [Oxygen-dependent plasminogen activation pathway and new physicochemical mechanisms of proteolysis]. *Izvestiya natsionalnoy akademii nauk Belarusi. Seriya mediko-biologicheskikh nauk*. [News of the National Academy of Sciences of Belarus. Series: Biomedical Sciences], 2001, no. 1, pp. 54–60. (In Russian)
27. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Some unusual manifestation of proteolysis. Cellular and Molecular Biology, 2006, vol. 52, no. 4, pp. 30-39.
28. Dean R.T., Roberts C.R., Jessup W. Fragmentation of extracellular and intracellular polypeptides of free radicals Progr. Clin. Biol. Res. 1985, Vol. 180, pp. 341-350.
29. Hall S., McDermott C., Anoopkumar-Dukie S., McFarland A.J., Forbes A., Perkins A.V., Davey A.K., Chess-Williams R., Kiefel M.J., Arora D., Grant G.D. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* / S. Hall, // *Toxins*. 2016. Vol. 8, no 8, 236. doi:10.3390/toxins8080236
30. Gonçalves Th., Vasconcelos U. Colour me blue: the history and the biotechnological potential of pyocyanin. *Molecules*. 2021. Vol. 26, no 927,pp. 1–18.
31. Lau G.W., Hassett D.J., Ran H., Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2004, vol.10, no.12, pp. 599–606.

Received 7 March 2023