

© Коллектив авторов, 2019

УДК 57.014

Гильяно Н.Я.<sup>1</sup>, Носкин Л.А.<sup>1</sup>, Журишкина Е.В.<sup>1</sup>, Степанов С.И.<sup>1</sup>,  
Ибатуллин Ф.М.<sup>1</sup>, Торшин В.И.<sup>2</sup>, Якунина Е.Б.<sup>2</sup>, Алчинова И.Б.<sup>3</sup>

## Комбинация низких доз глюкозамина и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константина НИЦ «Курчатовский институт»; 188300, Ленинградская обл., Гатчина, ул. Орлова Роща, д. 1;

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Химиотерапия опухолей традиционно направлена на ингибирование пролиферации раковых клеток и активацию апоптоза. В данной работе на клетках карциномы (линия HeLaG63) и эндотелиоцитах (линия ECV304) человека проведено сравнительное исследование эффектов низких концентраций (1,5—10 мМ) двух аналогов глюкозы: 2-DG и глюкозамина D. Оценка эффективности действия этих агентов проводилась по следующим параметрам: снижение жизнеспособности по МТТ-тесту, изменение проницаемости клеточной мембраны, изменение прогрессии по клеточному циклу, выраженность апоптотической гибели при культивировании клеток в питательной среде с различным содержанием глюкозы. Показано, что 48 часовая обработка 2-DG в исследованных концентрациях приводила к снижению доли клеток в G<sub>1</sub> и S-фазах и аккумуляции их в G<sub>2</sub>/M фазах. Глюкозамин D, в отличие от 2-DG при тех же концентрациях блокировал эти же клетки в G<sub>1</sub>/S фазе клеточного цикла. При обработке клеток HeLaG63 глюкозамин D оказывал более токсичное действие, чем 2-DG. При сочетанном воздействии 2-DG и глюкозамина D регистрировали существенное увеличение суб-G<sub>1</sub>-популяции по сравнению с раздельным воздействием. Эффективность обработки увеличивалась при снижении концентрации глюкозы в питательной среде и/или с увеличением дозы агентов. Эндотелиоциты (ECV304) были менее чувствительны, как к действию глюкозамина D, так и 2-DG, и сочетанное воздействие даже при концентрациях 10 мМ не отличалось от раздельного воздействия. Обработка клеток 10 мМ 2-DG и глюкозамина D приводила к увеличению проницаемости клеточных мембран для флуоресцентного красителя пропидиум йодида, при этом наибольшую эффективность регистрировали для клеток HeLaG63.

**Ключевые слова:** глюкозамин D, 2-деокси-D-глюкоза; HeLaG63, ECV304; МТТ-тест; проточная цитометрия; клеточный цикл; апоптоз.

**Для цитирования:** Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Журишкина Е.В., Степанов С.И., Ибатуллин Ф.М., Торшин В.И., Якунина Е.Б., Алчинова И.Б. Комбинация низких доз глюкозамина D и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 41-49.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02.41-49

**Для корреспонденции:** Гильяно Надежда Яковлевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. медицинской биофизики,

**e-mail:** giliano@omrb.pnpi.spb.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила** 13.03.2019

Giliano N.Y.<sup>1</sup>, Noskin L.A.<sup>1</sup>, Zhurishkina E.V.<sup>1</sup>, Stepanov S.I.<sup>1</sup>, Ibatullin F.M.<sup>1</sup>, Torshin V.I.<sup>2</sup>, Yakunina E.B.<sup>2</sup>, Alchinova I.B.<sup>3</sup>

## A combination of low-dose glucosamine D and 2-deoxy-D-glucose enhances the cytotoxic effect on cultured human tumor cells

<sup>1</sup>B.P. Konstantinov Petersburg Institute of Nuclear Physics of the Kurchatov Institute National Research Center, Orlova Roshcha Str. 1, Leningradskaya Region, Gatchina 188300, Russian Federation;

<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia, School of Medicine 6, Miklukho-Maklaya Str., Moscow 117198, Russian Federation;

<sup>3</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Chemotherapy for tumors has traditionally been aimed at inhibiting proliferation and activating apoptosis of cancer cells. **Aim.** To perform a comparative study of effects of two glucose analogues, 2-deoxy-D-glucose (2-DG) and glucosamine D, at low con-

centrations (1.5-10 mM) on carcinoma cells (HeLaG63 line) and endotheliocytes (ECV304 line). **Methods.** Efficacy of these agents was evaluated by decreased cell viability (MTT test), permeability of the cell membrane, changes in progression by the cell cycle, and apoptosis (cytometric method) of cells cultured in mediums with different glucose concentrations. **Results.** The 48-h 2-DG treatment of cells in the studied concentrations reduced the proportion of cells in G<sub>1</sub> and S-phases and their accumulation in G<sub>2</sub>/M phases. The same concentrations of glucosamine D, as distinct from 2-D, blocked the same cells in the G<sub>1</sub>/S phase of the cell cycle. The same concentrations of glucosamine D were more toxic to carcinoma cells than 2-DG. A combination of 2-DG and glucosamine D significantly greater increased the sub-G<sub>1</sub> population of HeLaG63 cells than either agent alone. The treatment effectiveness increased with a decrease in the glucose concentration in the medium and/or with an increase in the agent dose. Endotheliocytes (ECV304) were less sensitive to both glucosamine D and 2-DG, and the effect of their combination did not differ from the effect of either agent alone, even at concentrations of 10 mM. Treatment of cells with 10 mM 2-DG and glucosamine D increased the cell membrane permeability for the fluorescent dye, propidium iodide, with the greatest effect recorded for HeLaG63 cells. **Conclusion.** Therefore, the anticarcinogenic efficacy of glycolysis inhibitors can be enhanced, which would allow to considerably reduce their doses and avoid potential side effects induced by therapeutically effective drug concentrations.

**Keywords:** glucosamine D, 2-deoxy-D-glucose; HeLaG63, ECV304; MTT-test; flow cytometry; cell cycle; apoptosis.

**For citation:** Giliano N.Y., Noskin L.A., Zhurishkina E.V., Stepanov S.I., Ibatullin F.M., Torshin B.I., Yakunina E.B., Alchinova I.B. The combination of low doses of glucosamine D and 2-DG enhances the cytotoxic effect in human tumor cells in culture. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 41-49. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2019.02. 41-49

**For correspondence:** *Giliano N.Y.*, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», e-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Information about authors:**

Torshin V.I., <http://orcid.org/0000-0002-3950-8296>

Yakunina E.B., <http://orcid.org/0000-0002-7962-1971>

Alchinova I.B. <http://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

**Received** 13.03.2019

Химиотерапия опухолей традиционно направлена на ингибирование пролиферации раковых клеток, которое достигается за счет блокирования прогрессии по клеточному циклу. Известно, что опухолевые клетки проявляют устойчивость к апоптотической гибели, вследствие чего возрастает интерес к противоопухолевым препаратам, индуцирующим апоптоз. Широкий спектр фармакологических свойств глюкозамина D и 2-дезоксид-глюкоза (2-DG) привлекают внимание исследователей к этим агентам. Глюкозамин D, так же, как и 2-DG является аналогами глюкозы с той лишь разницей, что в составе глюкозамина присутствует аминогруппа. Показана антиоксидантная и противовоспалительная способность глюкозамина, что делает его привлекательным мультифункциональным терапевтическим агентом [1]. Глюкозамин D может как индуцировать, так и ингибировать апоптоз в зависимости от типа клеток и активности специфического биохимического пути. Показана *in vitro* токсичность глюкозамина D для ряда малигнанных клеточных линий, а также *in vivo* для клеток опухолей в концентрациях, имеющих малый эффект на нормальные клетки [2-4]. Противоопухолевая активность глюкозамина D исследуется более полуве-

ка, однако до настоящего времени механизмы противоопухолевого действия окончательно не ясны [5].

Известно, что 2-DG ингибирует транспорт глюкозы и гликолитическую продукцию АТФ, что широко используется в исследованиях в качестве метаболического ингибитора [7]. Показана токсичность 2-DG для различных типов раковых клеток и повышение эффективности лучевой и химиотерапии [6].

Ранее нами была показана селективная эффективность аналога глюкозы 2-DG в высоких концентрациях (20/40/80мМ) как индуктора апоптотической гибели опухолевых клеток и блокирования пролиферации в G<sub>2</sub>/M фазах клеточного цикла. Была показана также зависимость эффективности 2-DG- обработки клеток от уровня глюкозы в питательной среде [8].

В данной работе проведено сравнительное исследование влияния низких концентраций 2-DG и глюкозамина D на эндотелиоциты (линия ECV304) человека, на пролиферацию, прогрессию по клеточному циклу, апоптоз и повреждение клеточных мембран клеток карциномы (линия HeLaG63). Проведена оценка влияния этих веществ при различном содержании глюкозы в питательной среде.

## Методика

Работа выполнена на клетках карциномы шейки матки (линия HeLaG63), на эндотелиоцитах (линия ECV304) человека. Клетки культивировали на среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки и гентамицина (50мг/мл) («БиолоТ», Россия).

Клетки выращивали в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами, что позволяло одновременно проводить морфологический и цитометрический анализ одной и той же популяции клеток. После окрашивания ацетоорсеином подсчитывали процент морфологически измененных клеток (не менее чем на 1000 клеток) с помощью светового микроскопа «Motic» (Китай).

Клетки с поверхности флаконов смывали раствором Версена («Биолот», Россия). Клеточную суспензию центрифугировали, осадок суспендировали в растворе, содержащем 0,1 % бромистого этидия. Используя проточно-цитометрический анализ, получали распределение клеток по содержанию ДНК, что позволило проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2с- G1-фаза; 3с- S-фаза; 4с- G2/M-фазы, так и оценить цитотоксичность препаратов при анализе доли клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или суб-G1-популяцию). Последние появляются в результате фрагментации ядер в процессе апоптоза [9].

Жизнеспособность клеток оценивали по транспорту флюорохрома пропидий йодида (PI) [10], который проникает только через поврежденные мембраны клеток. Клетки с поверхности флакона снимали раствором Версена. Клеточную суспензию помещали на лед, добавляли раствор PI (конечная концентрация 1 мкг/мл) и анализировали на проточном цитометре (ПИ-ЯФ, Россия).

МТТ – метод изначально был разработан для оценки токсичности препаратов, но затем стал широко использоваться при оценке индукции или ингибирования клеточной пролиферации в моделях *in vitro*. Метод основан на восстановлении формазана с помощью внутриклеточных NAD(P)H-оксиредуктаз. При определенных условиях метаболическая активность этого фермента может отражать количество жизнеспособных клеток [11].

Клетки высевали на 96-луночные планшеты в концентрации 10 000 на лунку. Через 24 ч в лунки добавляли различные концентрации (от 1,5 до 20мМ) исследуемых веществ: 2-DG, D-глюкозамина. Через 48 ч и за 4 ч до фиксации в лунки добавляли МТТ (тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид). Оценивали оптическую плотность на ридере «Thermo Fisher» (США) при дли-

не волны 450 нм. Индекс жизнеспособности определяли как отношение (в %) оптической плотности экспериментальных образцов к контрольным. Статистическая обработка результатов проводилась в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). Эксперимент повторяли не менее 3 раз. В каждом случае анализировали не менее 20 тыс. клеток.

## Результаты и обсуждение

*Влияние низких концентраций глюкозамина на клетки различных опухолевых линий.* Оценка влияния различных концентраций D-глюкозамина на жизнеспособность клеток двух линий, проведенная с помощью МТТ метода, показала, что клетки карциномы (линия HeLaG63) проявляют большую чувствительность, и обнаруживают значительное дозозависимое снижение метаболической активности (рис. 1, А).

Появление суб- G<sub>1</sub> популяции при параллельном цитометрическом анализе состава клеточной популяции подтвердило высокую чувствительность клеток карциномы линии HeLaG63 к обработке глюкозамином D в концентрации до 20мМ (рис. 1, в). По сравнению с необработанным контролем (2%) уровень клеток с содержанием <2с увеличился почти в 8 раз (15%). Эндотелиоциты линии ECV304 в таких же условиях культивирования только замедляли прогрессию по клеточному циклу: доля клеток в фазе G1 увеличилась с 46% в контроле до 60% после обработки глюкозамином D. Доля клеток с содержанием ДНК <2с не увеличилась по сравнению с контролем, что позволяет предположить отсутствие апоптотической гибели. Морфологический анализ клеток линии ECV304 также не выявил фрагментации клеточных ядер, свойственной для апоптоза, несмотря на то, что концентрация 20мМ глюкозамина D считается токсичной для некоторых клеточных линий [12].

После 48-часовой инкубации клеток обеих линий с еще более низкими концентрациями глюкозамина D (3мМ и 10мМ) количество клеток HeLa в образцах по сравнению с контролем резко снижалось до 55 и 40% соответственно. Количество клеток ECV304 составило 95–85% от контроля (рис. 1, Б). Эти значения согласуются с результатами морфологического и цитометрического анализов, но противоречат данным, полученным с помощью МТТ метода. Так как при концентрации 10мМ глюкозамина D индекс жизнеспособности клеток ECV304 снижается до 50% (рис. 1, А). При увеличении концентрации глюкозамина D до 20мМ в клетках ECV304 регистрируется блокировка прогрессии по клеточному циклу, что, вероятно, приводит к снижению метаболической активности

NAD(P)H-зависимой оксиредуктазы, но не всегда приводит к гибели клеток этой линии. МТТ- тест позволяет определить метаболическую активность, которая качественно определяет наличие живых клеток, но дает лишь приблизительную оценку числа выживших [13].

Влияние низких концентраций 2-DG на клетки разных линий. Результаты экспериментов по сравнительной оценке цитотоксичности 2-DG для рассматриваемых клеточных линий показали дозозависимое снижение индекса жизнеспособности клеток при увеличении концентрации (рис. 2).

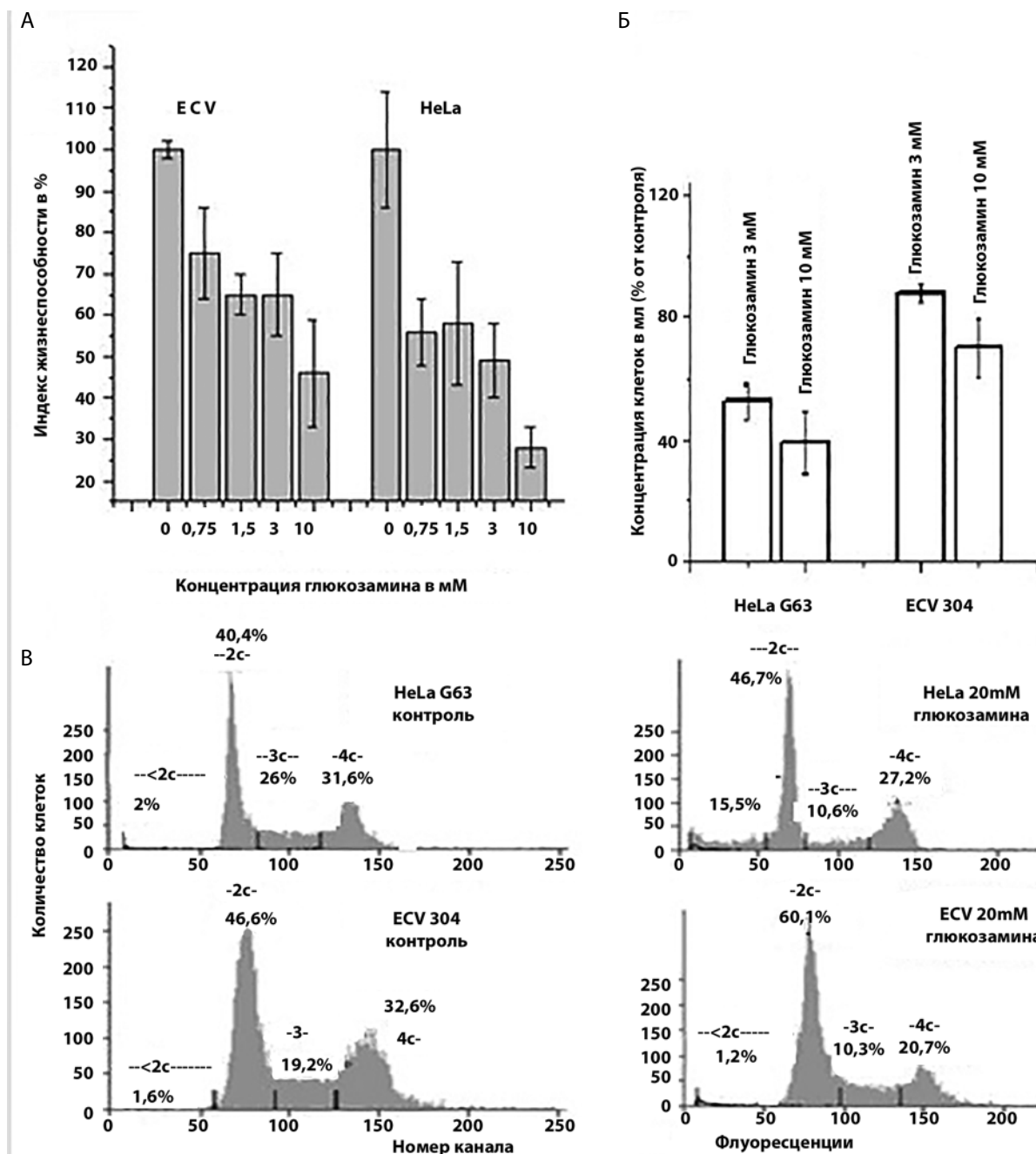


Рис. 1. А. Индекс жизнеспособности клеток в зависимости от концентрации глюкозамина D (по активности NAD(P)H-зависимой оксиредуктазы). Б. Относительная концентрация клеток после 48 часовой инкубации с 3 или 10 мМ глюкозамина D, в % к контролю. В. Распределение клеток по содержанию ДНК после 48 ч. инкубации клеток в питательной среде с 20мМ глюкозамина D.

С увеличением концентрации отчетливее проявлялись различия между клеточными линиями. Вместе с тем, отмечен одинаковый эффект для клеток HeLaG63 и ECV304 при концентрациях 10мМ и 20мМ соответственно.

*Исследование токсического действия глюкозамина D и 2-DG на жизнеспособность HeLaG63 при культивировании на средах с разным содержанием глюкозы.* Как показали наши исследования, фактором, влияющим

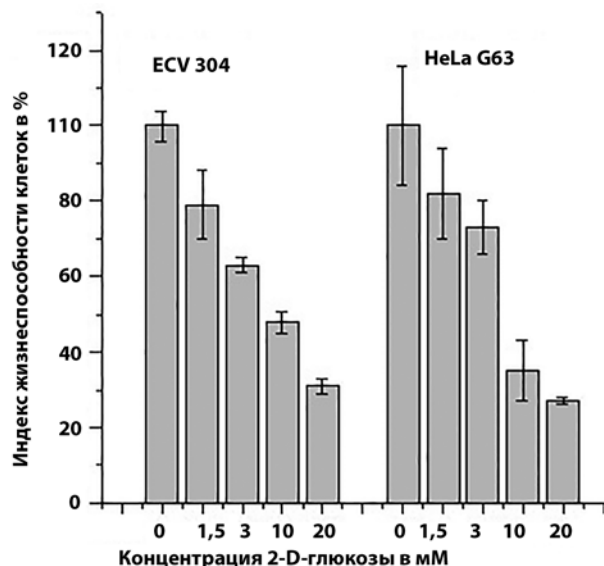


Рис.2. Индекс жизнеспособности клеток в зависимости от концентрации 2-DG (по активности NAD(P)H-зависимой оксиредуктазы).

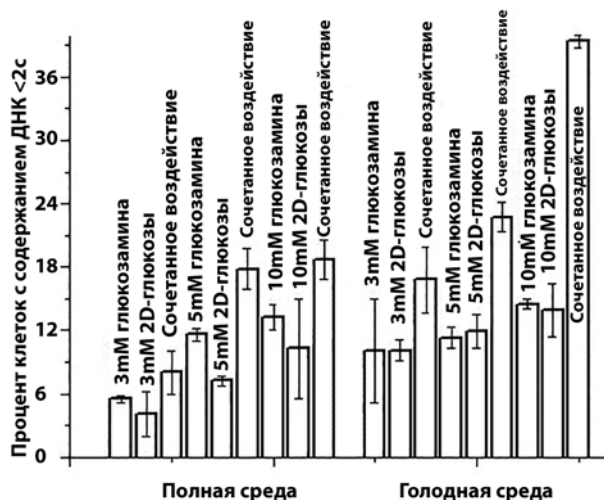


Рис.3. Процент клеток с содержанием ДНК меньше 2с, индуцированный разными концентрациями глюкозамина D и 2-DG в клетках HeLaG63 при инкубировании их в течение 48 ч. среде с разным содержанием глюкозы.

на токсичность низких концентраций 2-DG и глюкозамина D, является концентрация глюкозы в среде культивирования. С помощью проточной цитометрии определяли процент клеток с количеством ДНК меньше 2с (суб-G<sub>1</sub>). Последние считали клетками, находящимися в апоптозе. Было показано, что линия HeLa G63 проявляет дозозависимую чувствительность как к глюкозамину D, так и к 2-DG.

Увеличение в среде концентрации как глюкозамина D, так и к 2-DG приводило к возрастанию числа апоптотических клеток. Повреждающее действие глюкозамина D было более выраженным по сравнению с 2-DG, если среда содержала стандартное количество глюкозы (4 г/л). При уменьшении концентрации глюкозы до 1 г/л (голодная среда) цитотоксическое действие обоих веществ было одинаково (рис. 3).

Сочетанное использование препаратов в равных концентрациях вызывало повреждения в большем количестве клеток по сравнению с их отдельным применением. Низкое содержание глюкозы в среде культивирования также повышало токсичность глюкозамина D и 2-DG при их совместном использовании (рис. 3).

Обработка клеток глюкозамин D и 2-DG при отдельном и сочетанном использовании влияла на пролиферацию и приводила к накоплению клеток в фазе G<sub>1</sub> при культивировании на полной среде. Исключением стало сочетанное действие 10мМ глюкозамина D и 10мМ 2-DG, которое блокировало клетки в фазе G<sub>2</sub>/M (рис. 4).

Иная картина наблюдалась при инкубировании клеток в среде с низким содержанием глюкозы. Глюкозамин D увеличивал несущественно уровень G<sub>1</sub>-популяции клеток, а 2-DG как в концентрации 3мМ, так и 10мМ существенно увеличивала уровень G<sub>2</sub>/M-популяции. Сочетанное воздействие сопровождалось существенным снижением клеток к фазе G<sub>1</sub> и повышением уровня G<sub>2</sub>/M-популяции, что согласуется с данными литературы [14].

*Исследование токсического действия глюкозамина D и 2-DG на жизнеспособность ECV304 при культивировании на средах с разным содержанием глюкозы*

При культивировании клеток ECV 304 на полной среде (глюкоза 4 г/л) низкие концентрации (3мМ) и глюкозамина D, и 2-DG не повышали апоптотическую гибель клеток (суб-G<sub>1</sub> популяция менее 5% от общего числа клеток) и существенно не изменяли прогрессию клеток по циклу (рис.4).

Глюкозамин D в концентрации 10 мМ приводил к накоплению клеток в G<sub>1</sub>-фазе. Повышение концентрации 2-DG приводило в блокированию цикла в G<sub>2</sub>/M. Совместная обработка клеток этими вещества-

ми как в концентрации 3мМ так и концентрации 10мМ приводили к накоплению клеток в G<sub>1</sub>-фазе.

При культивировании клеток на голодной среде (глюкоза 1г/л) блокирование клеток в G<sub>1</sub>-фазе регистрируется уже и при низких концентрациях глюкозамина D и 2-DG. При концентрации 10мМ 2-DG индуцирует накопление клеток в G<sub>2</sub>/M фазах. Очевидно, что в клетках линии ECV 304 глюкозамин D индуцирует остановку клеточного цикла в G<sub>1</sub>-фазе, а 2-DG в G<sub>2</sub>/M.

Из вышеизложенного можно предположить, что ингибирование синтеза ДНК и блокирование перехода клеток из G<sub>1</sub>/S играют главную роль в ингибировании пролиферации клеток низкими концентрациями глюкозамина D. Как вероятный механизм противоопухолевого действия глюкозамина D в низких концентрациях рассматривают его влияние на семейство белков Cip/Kip, контролирующих переход клетки в митоз. Кроме того глюкозамин ингибирует фосфорилирование белка STAT3, основной мишенью которого является сурвивин - ингибитор апоптоза [15]. При

повышении концентрации глюкозамина D и снижении уровня глюкозы в питательной среде, определяющим фактором в ингибировании пролиферации выступает блокирование в G<sub>2</sub>/M- фазах. Сочетанное воздействие глюкозамина D и 2-DG в низких концентрациях приводит к снижению доли клеток в G<sub>1</sub> – фазе и увеличению доли клеток в G<sub>2</sub>/M.

Противоопухолевая активность глюкозамина D может быть связана с его способностью нарушать биосинтез холестерина, тем самым способствовать повреждению мембран [12, 16].

Инкубация клеток HeLaG63 в течение 48 ч как глюкозамином D, так и 2-DG приводит к увеличению проницаемости клеточных мембран и увеличению числа интенсивно-флюоресцирующих поврежденных клеток (окраска пропидий йодитом) по сравнению с необработанным контролем (рис. 6, А). Морфологический анализ подтвердил результаты цитометрического анализа (рис. 6, Б).

Таким образом, цитотоксичность низких концентраций глюкозамина D и 2-DG зависит от типа клеток

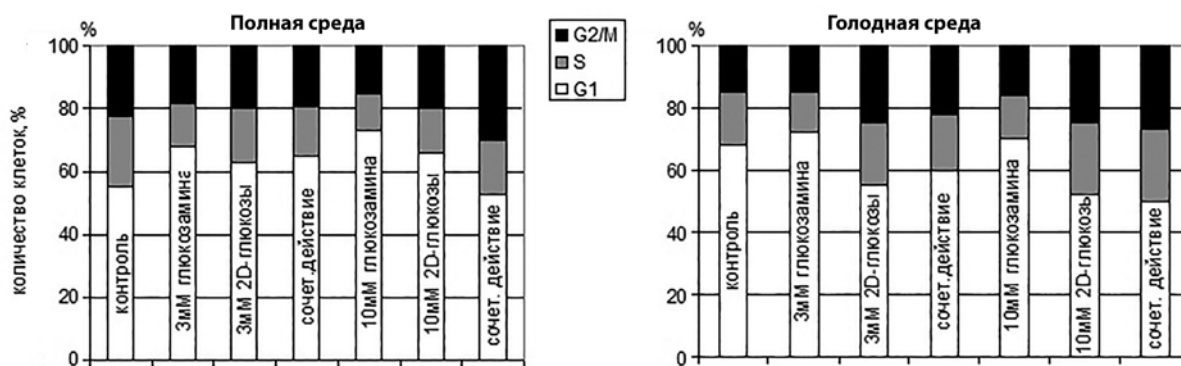


Рис. 4. Распределение клеток по фазам цикла, индуцированное 3 и 10мМ концентрациями глюкозамина D и 2-DG при воздействии на клетки HeLaG63 в среде с разным содержанием глюкозы.

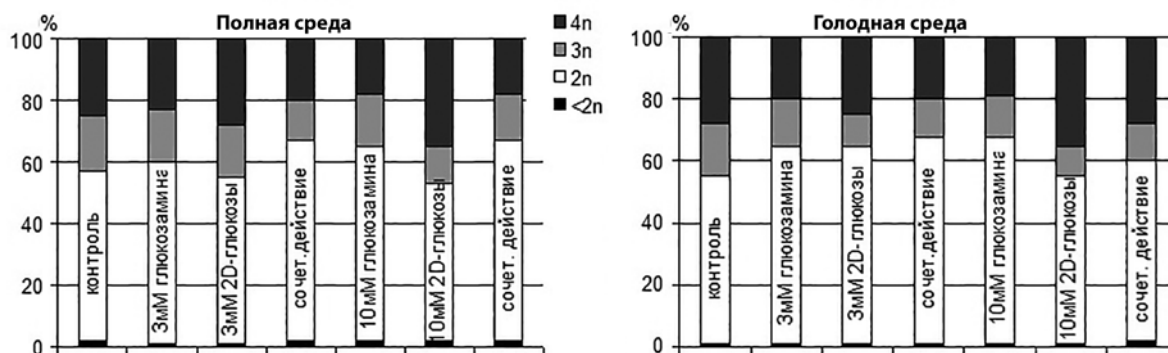
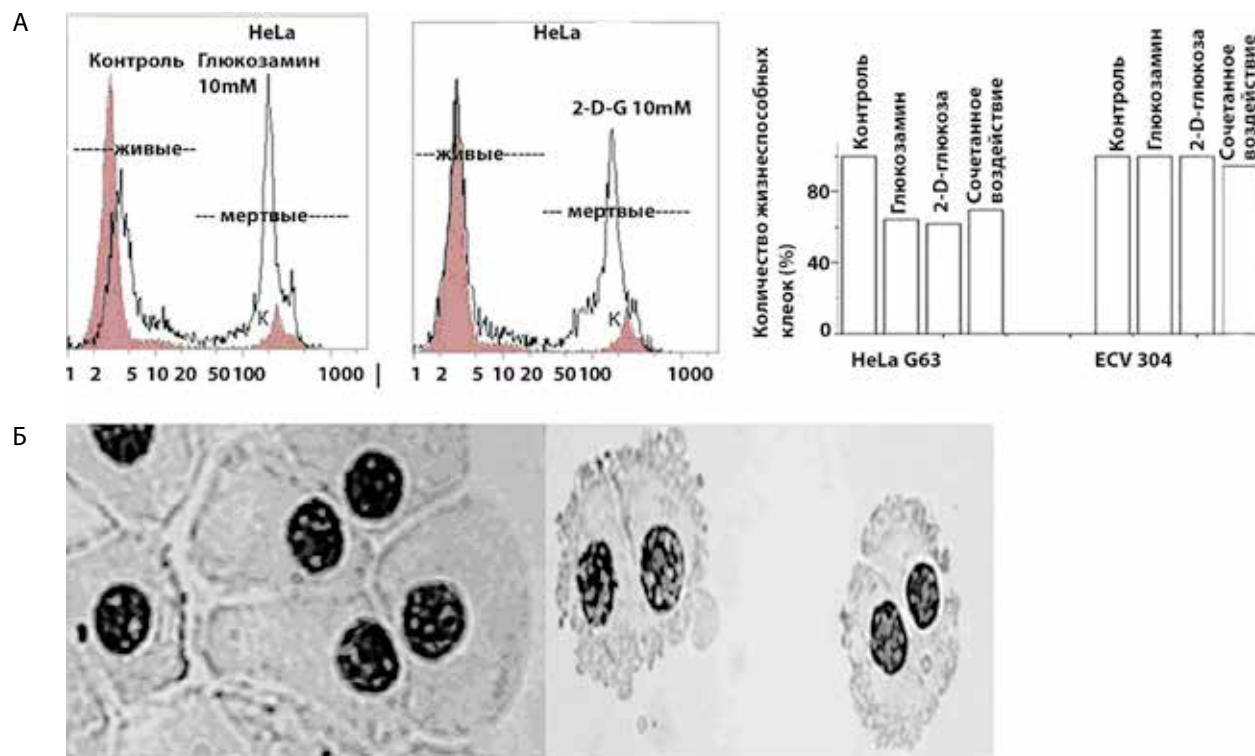


Рис. 5. Распределение клеток по фазам цикла, индуцированное различными концентрациями глюкозамина D и 2-DG при воздействии на клетки ECV304 в среде с разным содержанием глюкозы.

и от концентрации глюкозы в питательной среде. Клетки карциномы HeLaG63 проявляют наибольшую чувствительность к глюкозамину D, под действием, которого нарушается прогрессия по циклу и к 48 часам регистрируется рост апоптотической гибели клеток. Свой вклад в эту гибель привносят и поврежденные мембраны. Кроме того, низкое содержание глюкозы в среде и сочетанное применение с 2-DG значительно повышают цитотоксические свойства низких концентраций глюкозамина D. Это согласуется с результатами исследований, где было показано, что высокий уровень глюкозы ослабляет противоопухолевый эффект 5-фторурацила (5-Fu) для клеток рака поджелудочной железы AsPC-1. Предполагается, что уровень сахара в крови пациента может влиять на эффект химиотерапии [17, 18]. Эндотелиоциты ECV304 были менее чувствительны как к обработке глюкозамином D, так и к 2-DG в исследованных концентрациях. Снижение уровня глюкозы в питательной среде незначительно увеличивало цитотоксичность глюкозамина D и 2-DG в эндотелиоцитах, что согласуется с нашими ранними результатами [19].

Исследованные нами 2 аналога глюкозы со сходным механизмом действия при низких концентрациях включали в клетках различные чек-пойнты: глюкозамин D ингибировал прогрессию клеток из  $G_1$  в S-фазу, а 2-DG блокировала клетки в  $G_2/M$ . Ингибирование сразу двух чек-пойнтов при сочетанном воздействии приводило к увеличению цитотоксичности даже низких концентраций глюкозамина D и 2-DG. Повышенная зависимость опухолевых клеток от глюкозы приводила к увеличению цитотоксичности аналогов глюкозы при культивировании клеток в среде с низким содержанием глюкозы. Для эндотелиоцитов, сохранивших особенности нормальных клеток, блокирование прогрессии по циклу было обратимым и не приводило к гибели клеток. Полученные результаты указывают на то, что антиканцерогенную эффективность ингибиторов гликолиза можно повысить, используя сочетанное воздействие двух ингибиторов, что позволяет значительно уменьшать дозы, сохранить селективность и избежать возможных побочных эффектов, вызываемых терапевтически эффективными концентрациями препаратов.



**Рис. 6.** А. Гистограммы распределения клеток HeLa G 63 по интенсивности флюоресценции после обработки ИР. Заштрихованная гистограмма – без обработки; незаштрихованная — после 48 ч инкубации 10мМ глюкозамина D и 2-ДВ. Б. Морфологические изменения клеточной мембраны до и после обработки клеток HeLa G 63 10мМ глюкозамином D.

## Литература

## References

1. Dalirfardouei R., Rfrimi G., Jamialahmadi K. Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent. *Life Science*. 2016; 152: 21-9.
2. Zhang L, Liu W-S, Han B-Q et al. Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2006; 7: 608-14.
3. Xu W., Jiang C., Kong X. et al. Chitooligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses. *Mol. Med. Rep.* 2012; 6 (2): 385-90.
4. Jung CW1, Jo JR, Lee SH et al. Anti-cancer properties of glucosamine-hydrochloride in YD-8 human oral cancer cells: Induction of the caspase-dependent apoptosis and down-regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Toxicol In Vitro*. 2012; Feb; 26(1): 42-50.
5. Quastel JH, Cantero A. Inhibition of tumor growth by D-glucosamine. *Nature*. 1953; 171: 252-4.
6. Lee A.M. Glucose regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat. Rev. Cancer*. 2014; 14(4): 263-76.
7. Zhang X. D., Deslandes E., Villedieu M. et al. Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Various Malignant Cell Lines In Vitro. *ANTICANCER RESEARCH*. 2006; 26: 3561-6.
8. Гильяно Н.Я., Бондарев Г.Н., Конева Л.В. и др. Возможные механизмы селективного действия ингибиторов гликолиза на эндотелиоциты и клетки карциномы человека в культуре. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 58(4): 78-85.
9. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics*. Cambridge university press. 2005.
10. Jonson S, Nguyen V., Coder D. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley& Sons, Inc. 2013. Supplement 64. Unit 9.2
11. Berridge M.V., Tan A.S., Herst P.M. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11. 2005; 127-52.
12. Friedman SJ, Skehan P. Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 1172-6.
13. Quent VM1, Loessner D, Friis T, et al. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(4): 1003-13.
14. Masson E, Wiernsperger N, Lagarde M et al. Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides. *Biochem. J*. 2005; 388: 537-44.
15. Chesnokov V, Sun Ch., Itakura K. Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling. *Cancer Cell International*. 2009; 9: 25.
16. Friedman SJ, Cheng S, Skehan P. Mechanisms of cholesterol synthesis inhibition by D-glucosamine. *Can J Biochem Cell Biol*. 1985; 63(12): 1253-7
17. Chengy Y., Diao D., Zhang H. et al. Dang C. High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose. *Biomedical Reports*, 2014; 2: 188-92.
18. Chen H, Yao W, Chu Q et al. Synergistic effects of metformin in combination with EGFR-TKI in the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer and type 2 diabetes. *Cancer Lett*. 2015; 369(1): 97-102
19. Гильяно Н.Я., Семенова Е.Г., Федорцева Р.Ф., Конева Л.В. Характеристика спонтанно-трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV 304. Функциональные особенности клеток. *Цитология*. 2008; 50 (7): 576-85.
1. Dalirfardouei R., Rfrimi G., Jamialahmadi K. Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent. *Life Science*. 2016; 152: 21-9.
2. Zhang L, Liu W-S, Han B-Q et al. Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2006; 7: 608-14.
3. Xu W., Jiang C., Kong X. et al. Chitooligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses. *Mol. Med. Rep.* 2012; 6(2): 385-90.
4. Jung CW1, Jo JR, Lee SH et al. Anti-cancer properties of glucosamine-hydrochloride in YD-8 human oral cancer cells: Induction of the caspase-dependent apoptosis and down-regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Toxicol In Vitro*. 2012; Feb; 26(1): 42-50.
5. Quastel JH, Cantero A. Inhibition of tumor growth by D-glucosamine. *Nature*. 1953; 171: 252-4.
6. Lee A.M. Glucose regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat. Rev. Cancer*. 2014; 14(4): 263-76.
7. Zhang X. D., Deslandes E., Villedieu M. et al. Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Various Malignant Cell Lines In Vitro. *ANTICANCER RESEARCH*. 2006; 26: 3561-6.
8. Giliano N Y, Bondarev G N, Konevega L V. et al. Possible mechanism of the selective action of the inhibitors of glycolysis in the endothelial cells and the human carcinoma cells in the. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58(4): 78-85. (in Russian)
9. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics*. Cambridge university press. 2005.
10. Jonson S, Nguyen V., Coder D. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley& Sons, Inc. 2013. Supplement 64. Unit 9.2
11. Berridge M.V., Tan A.S., Herst P.M. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11. 2005. 127-52.
12. Friedman SJ, Skehan P. Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 1172-6.
13. Quent VM1, Loessner D, Friis T, et al. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(4): 1003-13.
14. Masson E, Wiernsperger N, Lagarde M et al. Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides. *Biochem. J*. 2005; 388: 537-44.
15. Chesnokov V, Sun Ch., Itakura K. Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling. *Cancer Cell International*. 2009; 9: 25.
16. Friedman SJ, Cheng S, Skehan P. Mechanisms of cholesterol synthesis inhibition by D-glucosamine. *Can J Biochem Cell Biol*. 1985; 63(12): 1253-7.
17. Chengy Y., Diao D., Zhang H. et al. Dang C. High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose. *Biomedical Reports*, 2014; 2: 188-92.
18. Chen H, Yao W, Chu Q et al. Synergistic effects of metformin in combination with EGFR-TKI in the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer and type 2 diabetes. *Cancer Lett*. 2015; 369(1): 97-102.
19. Giliano N.Ya., Semenova E.G., Fedortseva R.F, Konevega L.V. Characteristic of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV 304. Functional responses of the ECV 304 cells. *Tsitologiya*. 2008; 50(7): 576-85. (in Russian)



**Сведения об авторах:**

**Гильяно Надежда Яковлевна**, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. медицинской биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru;

**Носкин Леонид Алексеевич**, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. медицинской биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: lanoskin42@mail.ru;

**Ибатуллин Фарид Миникасимович**, канд. хим. наук, зав. лаб. биоорганической и медицинской химии Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт»;

**Журишкина Елена Васильевна**, инженер, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт»;

**Степанов Сергей Иванович**, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: stepanovsmai@gmail.com;

**Алчинова Ирина Борисовна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alchinovairina@yandex.ru;

**Торшин Владимир Иванович**, доктор биол. наук, проф., зав. каф. нормальной физиологии Медицинского института, ФГАОУ ВО РУДН, e-mail: vtorshin@mail.ru;

**Якунина Елена Борисовна**, канд. мед. наук, ассистент каф. нормальной физиологии Медицинского института, ФГАОУ ВО РУДН, e-mail: yakunina@list.ru