

© Коллектив авторов, 2022

УДК 57.014

Гильяно Н.Я.¹, Дуботолова М.М.¹, Носкин Л.А.¹, Степанов С.И.¹, Арутюнян А.В.¹, Алчинова И.Б.², Ибатуллин Ф.М.¹

D-глюкозамин индуцирует различные формы гибели опухолевых клеток

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Россия, ул. Орлова Роща, д. 1;²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Введение. D-глюкозамин – природный аминсахар, который используется в медицинской практике поскольку проявляет противовоспалительное, антиоксидантное, антивозрастное, противодифиброзное, нейропротекторное и кардиопротекторное действие. **Цель работы** – оценка влияния D-глюкозамина на пролиферацию, апоптоз и аутофагию в нейронах крысы линии PC12 в норме и в условиях аминокислотного и углеводного голодания.

Методика. Работа выполнена на клеточной линии PC 12, которая представляет собой феохромоцитому крысы. Клетки имеют физиологические и биохимические характеристики нейронов, способны продуцировать катехоламины и широко используются в исследованиях болезни Альцгеймера и Паркинсона. Клетки выращивали в условиях аминокислотного голодания и/или при низком уровне глюкозы (углеводное голодание). Для оценки активности деления клеток и клеточной гибели использовали проточную цитометрию, морфологический анализ состава и размера клеточных популяций с использованием специфических красителей. Оценку размера везикул, образующихся в результате аутофагии, проводили методом лазерной корреляционной спектроскопии.

Результаты. Культивирование клеток линии PC12 в среде с низким содержанием глюкозы и аминокислот запускает механизм апоптотической гибели, но добавление D-глюкозамина в концентрации 1 ммоль/л оказывает протекторное воздействие и снижает уровень популяции <2с. **Добавление D-глюкозамина** в концентрациях 5 ммоль/л и 10 ммоль/л снижало выживаемость клеток и уменьшало количество колоний. Прижизненная окраска клеток акридиновым оранжевым не выявила фрагментации ядерного материала, окраска клеток монодансилкадаверином позволила наблюдать множество аутофагальных вакуолей. Наличие свободной аминогруппы у молекулы D-глюкозамина является фактором, вызывающим аутофагию большей интенсивности. Микровезикулы, формирующиеся в результате отпочковывания плазматической мембраны, образуют две фракции частиц: одна в пределах 200, другая – 1000 нм.

Заключение. Цитотоксический эффект D-глюкозамина на клетках PC12 реализуется через индукцию аутофагии, вероятно, через ингибирование фосфорилирования m-TOR, что делает этот природный представитель аминсахаров возможным конкурентом рапамицина. D-глюкозамин безопасен даже при длительном применении у людей, включая пациентов с нарушенной толерантностью к глюкозе или диабетом.

Ключевые слова: апоптоз, аутофагия, D-глюкозамин, ингибиторы гликолиза, клеточный цикл, нейроны.

Для цитирования: Гильяно Н.Я., Дуботолова М.М., Носкин Л.А., Степанов С.И., Арутюнян А.В., Алчинова И.Б., Ибатуллин Ф.М. D-глюкозамин индуцирует различные формы гибели опухолевых клеток. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 85–95.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.85-95

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гильяно Н.Я., Ибатуллин Ф.М.; сбор и обработка материала – Дуботолова М.М., Степанов С.И., Арутюнян А.В., Гильяно Н.Я.; подготовка иллюстративного материала – Дуботолова М.М., Степанов С.И., Арутюнян А.В., Гильяно Н.Я., Алчинова И.Б.; статистическая обработка – Дуботолова М.М.; написание текста – Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Алчинова И.Б.; редактирование – Алчинова И.Б., Ибатуллин Ф.М.

Для корреспонденции: Гильяно Надежда Яковлевна, e-mail: gilyano_nj@npni.nrcki.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме: «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер №121060200125-2) и частично «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» (№FGFU-2022-0010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Поступила 16.11.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Giliano N.Ya.¹, Dubotolova M.M.¹, **Noskin L.A.**¹, Stepanov S.I.¹, Arutyunyan A.B.¹, Alchinova I.B.², Ibatullin F.M.¹**D-Glucosamine induces various forms of cancer cell death**¹B.P. Konstantinov Petersburg Institute of Nuclear Physics of the Kurchatov Institute National Research Center, Orlova Roshcha St. 1, Leningradskaya Region, Gatchina 188300, Russian Federation;²Institute of General Pathology and Pathophysiology», Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

D-glucosamine is a natural amino sugar that is used in medical practice due to its anti-inflammatory, antioxidant, anti-aging, anti-fibrotic, neuroprotective and cardioprotective properties. The aim of this work was to evaluate the effects of D-glucosamine on proliferation, apoptosis, and autophagy in PC12 rat neurocytes during starvation and under normal conditions. Methods. The study was performed on PC 12 cells, which represent rat pheochromocytoma. These PC12 cells have the physiological and biochemical characteristics of neurons. They are able to produce catecholamines, and they are widely used in Alzheimer's and Parkinson's disease research. Starvation conditions were achieved by reducing the concentration of glucose (carbohydrate starvation) and/or serum (amino acid starvation). Cell division activity and cell death were assessed by flow cytometry and by morphological analysis of the composition and size of cell populations using acridine orange and monodansylcadaverine staining. The size of vesicles formed due to autophagy was assessed using laser correlation spectroscopy.

Results. Cultivation of PC12 cells under the starvation conditions triggered the mechanism of apoptotic death, whereas D-glucosamine at 1 mM had a protective effect and reduced the cell population to <2c. The addition of glucosamine at 5 and 10 mM reduced both cell survival and the number of colonies. Intravital staining of cells with acridine orange did not detect fragmentation of nuclear material, whereas staining of cells with monodansylcadaverine detected autophagic vacuoles. Microvesicles resulting from budding of the plasma membrane formed two fractions of particles with average sizes of 200 and 1000 nm.

Conclusion. The cytotoxic effect of D-glucosamine on PC12 cells is caused by the induction of autophagy, probably through the inhibition of m-TOR phosphorylation, which allows us to consider D-glucosamine as a possible competitor of rapamycin. D-glucosamine is safe even for long-term use in humans, including patients with impaired glucose tolerance or diabetes.

Keywords: apoptosis, autophagy, D-glucosamine, glycolysis inhibitors, cell cycle, neurocytes.

For citation: Giliano N.Ya., Dubotolova M.M., **Noskin L.A.**, Stepanov S.I., Arutyunyan A.B., Alchinova I.B., Ibatullin F.M. D-Glucosamine induces various forms of cancer cells death. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 85–95. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.85-95

Autor's contribution: study concept and design – Giliano N.Ya, Ibatullin F.M.; collection and processing of material – Dubotolova M.M., Stepanov S.I., Arutyunyan A.B., Giliano N.Ya.; preparation of illustrative material – Dubotolova M.M., Stepanov S.I., Arutyunyan A.B., Alchinova I.B., Giliano N.Ya.; statistical processing – Dubotolova M.M.; writing text – Giliano N.Ya., **Noskin L.A.**, Alchinova I.B.; editing – Alchinova I.B., Ibatullin F.M.

For correspondence: *Nadezhda Ya. Gilyano*, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», e-mail: gilyano_nj@pnpi.nrcki.ru

Financing. The work was carried out within the framework of the state task on the topic: «The study of molecular and cellular components of the pathogenesis of socially significant diseases for the development of methods of early diagnosis and treatment» (registration number No. 121060200125-2) and partially «Assessment of adaptive responses of the organism to the action of physicochemical and environmental factors» (No. FGFU-2022-0010).

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

Information about the authors:Dubotolova M.M. <https://orcid.org/0000-0001-6950-1135>**Noskin L.A.**, <https://orcid.org/0000-0001-6162-8246>Alchinova I.B., <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>Ibatullin F.M., <https://orcid.org/0000-0002-7660-4172>

Received 16.11.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Giliano N.Ya., <https://orcid.org/0000-0002-1910-2598>Stepanov S.I., <https://orcid.org/0000-0001-8850-6265>

D-глюкозамин (GlcN) — представитель природных аминокислот, который давно используются в медицинской практике, поскольку обладает целым рядом защитных свойств. Он оказывает противовоспалительное, антиоксидантное, антивозрастное, противомитохондриальное, нейропротекторное и кардиопротекторное действие. Показано, что GlcN обладает также противо-

опухолевой активностью, влияя на ферментативные каскады, участвующие в гибели клеток, их пролиферации и ангиогенезе [1]. Ранее нами была показана селективная цитотоксичность GlcN в отношении опухолевых клеток человека в культуре в концентрациях, нетоксичных для нормальных клеток. При сочетанном воздействии GlcN и 2-дезоксид-Д-глюкозы (2DG) реги-

стрировали синергизм в индукции апоптоза, который усиливался при культивировании клеток в питательной среде с низким содержанием глюкозы [5]. Известно, что GlcN может как индуцировать, так и ингибировать апоптоз в зависимости от типа клеток и активности специфического биохимического пути. Кроме того, показано, что GlcN может активировать аутофагию как *in vitro*, так и *in vivo* [6]. Аутофагия и апоптоз часто запускаются одними и теми же стимулами, у них общие эффекторы и регуляторы, и, очевидно, что между этими двумя процессами существует сложная перекрестная связь.

Известно, что GlcN ингибирует N-гликозилирование, которое коррелирует с глюкозамин-индуцированной цитотоксичностью. Гликозилирование является одной из форм посттрансляционной модификации белков, определяющей их структуру и функции. Для включения аутофагии и образования вакуолей необходим белок Arg2, который является белком периферической мембраны. Функция белков ATG, в частности, их способность взаимодействовать с рядом макроаутофагических регуляторов, модулируется посттрансляционными модификациями. Например, модификация аутофагии TOR (мишень рапамицина) происходит частично за счет фосфорилирования киназы – инициатора аутофагии Atg1 (ULK1 у млекопитающих) и ее регулятора Atg13 [7]. Предполагается, что в основе механизма действия GlcN лежит ингибирование фосфорилирования m-TOR [7, 8]. При этом регистрируется и mTOR-независимый путь глюкозамин-индуцированной аутофагии [9].

Цель – оценка влияния GlcN на пролиферацию, апоптоз и аутофагию в норме и в условиях аминокислотного и глюкозного голодания в нейронах крысы линии PC12.

Методика

Работа выполнена на клеточной линии PC 12, которая представляет собой феохромоцитому крыс. Клетки имеют физиологические и биохимические характеристики нейронов, способны продуцировать катехоламины и широко используются в исследованиях болезни Альцгеймера и Паркинсона.

Для культивирования клеток использовали среды и добавки фирмы «Биолот», Россия. Клетки культивировали в среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки и гентамицина (50 мкг/мл). В работе использованы гидрохлорид D-глюкозамина (GlcN), 2-дезоксид-глюкозы (2DG) и рапамицин («Sigma», США).

Для окрашивания клеток использовали бромистый этидий, акридиновый оранжевый (АО), флуоресцеин

диацетат (ФДА), метилвиолет и монодансилкадаверина (MDC). Все красители производства «Sigma», США.

Цитометрический анализ распределения клеток по содержанию ДНК. Проточно-цитометрический анализ проводили на цитометре (FACS, США). Клетки, выросшие на поверхности флаконов, снимали раствором Версена («Биолот», Россия). Клеточную суспензию центрифугировали, осадок суспендировали в растворе бромистого этидия [10]. Затем оценивали распределение клеток по содержанию ДНК, которое позволяет проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2с- G_1 -фаза; 3с- S – фаза; 4с- G_2/M -фазы, так и оценить цитотоксичность препаратов, анализируя долю клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или sub- G_1 -популяцию), возникающую в результате фрагментации ядра в процессе апоптотической гибели клеток [11].

Морфологический анализ состава клеточной популяции. Аутофагию оценивали по вакуолизации цитоплазмы и образованию везикул при морфометрическом анализе и по окрашиванию клеток акридиновым оранжевым (АО), а также по накоплению селективного флуоресцентного маркера аутофагических вакуолей монодансилкадаверина (MDC), который взаимодействуя с мембранными липидами, концентрируется в аутофагических компартментах. АО интеркалирует в ДНК, имеет максимальное возбуждение при длине волны 502 нм и 525 нм (зеленый цвет). Способность противостоять низкому pH позволяет АО проникать в «кислые» органеллы, такие как лизосомы и фаголизосомы.

Клетки культивировали в течение 24 ч в нормальной питательной среде с 10% сыворотки и 4 г/л глюкозы, затем для индукции аутофагии часть клеток культивировали в течение 3 ч в питательной среде без сыворотки или с низким содержанием глюкозы (1 г/л). Для индукции аутофагии также использовали ингибитор mTOR рапамицин (50 мкмоль/л). После 3-часовой инкубации среду аккуратно удаляли, флаконы промывали раствором фосфатного буфера. Для выявления аутофагосом добавляли MDC (50 мкмоль/л) и инкубировали при 37 °C в течение 10 мин. Изображения получали под флуоресцентным микроскопом «EVOS» (возбуждение: 390 нм, испускание: 460 нм). В каждой группе было проанализировано не менее 100 клеток.

Оценка аутофагии методом лазерной корреляционной спектроскопии. Клетки, подвергшиеся аутофагии, очень легко отсоединяются от подложки и всплывают. Анализ проводили как на нативных, так и на фиксированных этанолом образцах. При увеличении продолжительности инкубации клеток в голодной среде или

с ингибитором аутофагии значительная часть аутофагических клеток, распавшись на везикулы, переходит в питательную среду.

Для приготовления образцов культуральную жидкость сливали, во флаконы вносили буфер без KCl, после аккуратного встряхивания образцы переносили в пробирки типа «эппендорф» и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант проанализировали на установке многоуглового динамического светорассеяния (Dynamic Light Scattering — DLS) [12]. Источник линейно поляризованного излучения — одномодовый He-Ne лазер ЛГН-215 со световой мощностью 15 мВт. Фотоприемником служит фотосенсорный модуль (ФЭУ) серии H10721 (Hamamatsu). Спектр рассеянного света определяли посредством быстрого Фурье-анализа фототока с помощью IBM-совместимого многофункционального измерительного устройства E14-440, разработанного ЗАО «L-CARD» [13].

Оценка репродуктивной выживаемости клеток. Влияние GlcH на жизнеспособность клеток PC12 оценивали также и по репродуктивной выживаемости. Для этого в планшеты высевали по 500 клеток на лунку и через 24 ч после инкубации в части лунок меняли питательную среду на среду с 5 и 10 ммоль/л GlcH. После 24-часового воздействия глюкозамина клетки культивировали 7 сут и фиксировали колонии спиртовым раствором метилвиолет. Подсчет количества и клеточности колоний проводили с использованием микроскопа «EVOS».

Статистическая обработка результатов проводилась в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США) с использованием *t*-теста Стьюдента (уровень значимости $p < 0.05$). Эксперимент повторяли не менее 3 раз. В каждом образце анализировали не менее 20 тыс. клеток. Каждая точка представляет среднее арифметическое значение 3-5 повторов (%) \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

Результаты и обсуждение

Ранее нами была исследована роль супероксида, оксида азота и металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте перекиси водорода и бета-амилоида на клетки линии PC 12. Оба агента индуцировали окислительный стресс, который приводил к индукции апоптотической гибели клеток. Обработка клеток донором NO или хелатором ионов железа снижала внутриклеточный уровень супероксида и долю апоптотически гибнущих клеток [14]. Позднее причинно-следственная связь окислительного стресса и апоптотической гибели клеток PC 12 была показана в работе

других авторов, которые показали индукцию апоптоза культивированием клеток в голодной среде (без глюкозы) [15]. Однако, известно, что в условиях голодания в первую очередь включается аутофагия, которую и характеризовали как клеточный ответ на нехватку аминокислот.

В представленной работе клетки культивировали в питательной среде с разным уровнем глюкозы (4 г/л или 1 г/л), с 10% эмбриональной сывороткой или без сыворотки. Для оценки влияния глюкозамина на клетки его добавляли в концентрациях 1 ммоль/л, 5 и 10 ммоль/л и через 24 ч после этого проводили цитометрический анализ состава популяции (рис. 1).

Такая многокомпонентная схема проведения эксперимента позволила оценить протекторный эффект глюкозамина при ограниченном доступе клеток к глюкозе и аминокислотам.

При оценке цитотоксичности по доле клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или sub-G₁-популяцию), возникающей в результате апоптотической фрагментации ядра показано, что клетки линии PC12 были более чувствительны к отсутствию сыворотки в питательной среде, чем к снижению уровня глюкозы. Так, отсутствие сыворотки более чем вдвое увеличивало долю с содержанием ДНК <2с при нормальном уровне глюкозы, а снижение уровня глюкозы с 4 г/л до 1 г/л существенно увеличивало долю таких клеток до 19.4 \pm 2.0 (таблица).

Обработка клеток GlcH при культивировании клеток в нормальной среде и среде с низким содержанием глюкозы существенно не меняла долю апоптотических клеток. При отсутствии в среде сыворотки добавление GlcH в концентрации 1 ммоль/л к клеточной культуре снижало уровень клеток в суб-G₁ фракции как при нормальном уровне глюкозы, так и при низком. При высоких концентрациях 5 ммоль/л и 10 ммоль/л GlcH не оказывал протекторного действия.

Таким образом, культивирование клеток в среде с низким содержанием глюкозы и аминокислот запускает механизм апоптотической гибели, но добавление глюкозамина в концентрации 1 ммоль/л оказывает протекторное воздействие и снижает уровень популяции <2с.

Добавление GlcH к суточной культуре клеток PC 12 и экспонирование с ним в течение 24 ч в концентрациях 5 ммоль/л и 10 ммоль/л снижало выживаемость клеток и колониестимулирующую способность. Оценку этих параметров проводили через 7 сут после добавления GlcH. Обработанные клетки образовали меньше колоний, и количество клеток в колониях сильно различалось (рис. 2).

В контрольной группе каждая колония содержала в себе более 100 клеток, после обработки 5 ммоль/л GlcH около 50, а после 10 ммоль/л GlcH <50 клеток. Под влиянием D-глюкозамина количество колоний существенно снижалось. В процентном отношении к контролю обработка 5 ммоль/л снижала клоногенную выживаемость на 26%, а 10 ммоль/л – на 40%. Очевидно, что GlcH в используемых концентрациях ингибирует рост и выживаемость клеток линии PC12,

так же, как и клеток линии HeLaG63, описанных нами ранее [16].

Параллельные морфологический и цитометрический анализы культуры клеток PC12 после 24-х-часовой обработки их 10 ммоль/л GlcH показали, что уровень суб-G1 популяции по сравнению с контролем не меняется. Прижизненная окраска этих клеток АО не выявила фрагментации ядерного материала, свидетельствующей об апоптотиче-

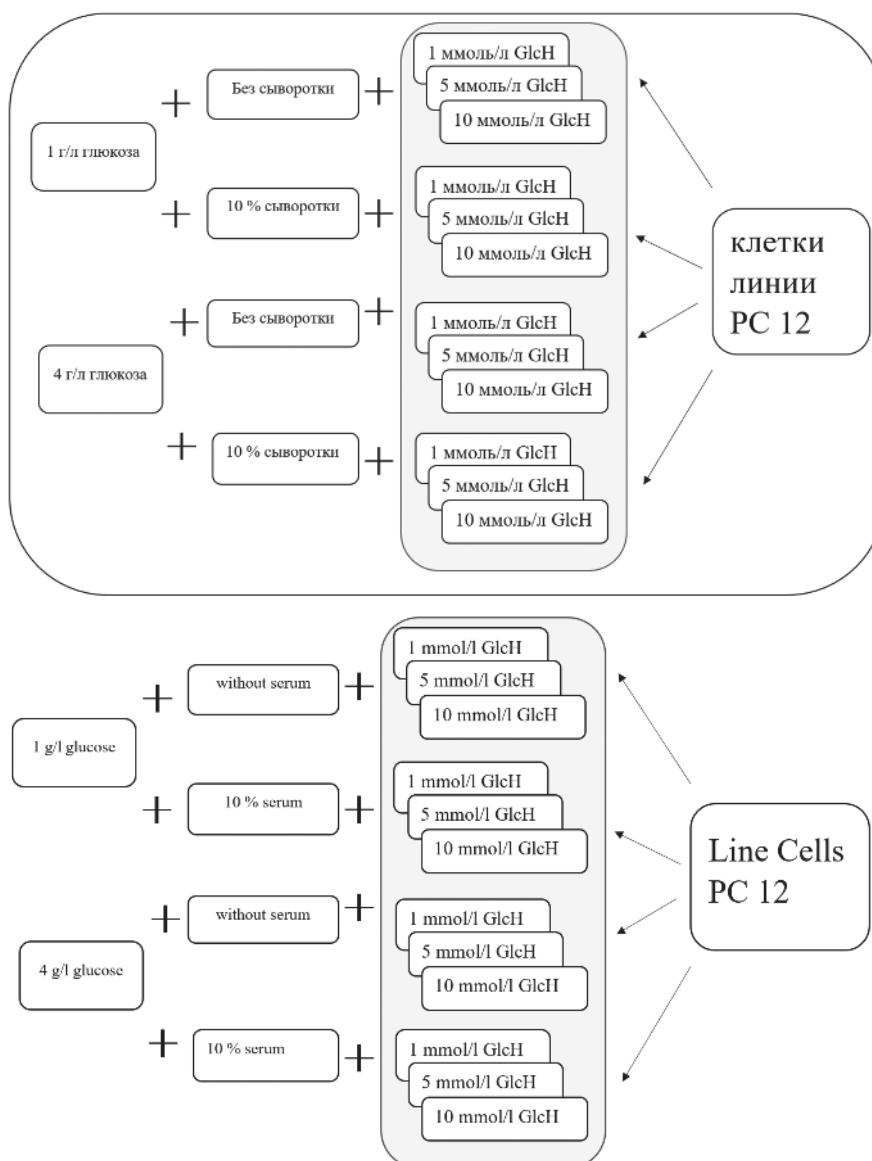


Рис. 1. Схема подготовки образцов для цитометрического анализа распределения клеток по количеству ДНК.

Fig. 1. Scheme of sample preparation for cytometric analysis of cell distribution by DNA amount.

ской гибели клеток. В то же время, дополнительная окраска клеток МДС специфическим красителем для обнаружения аутофагальных вакуолей позволяет наблюдать множество везикул (рис. 3).

Как положительный контроль были использованы клетки HeLa G63. Обработка клеток этой клеточной линии 10 ммоль/л GlcH приводит к появлению признаков апоптотической гибели: возрастание суб-G1 по-

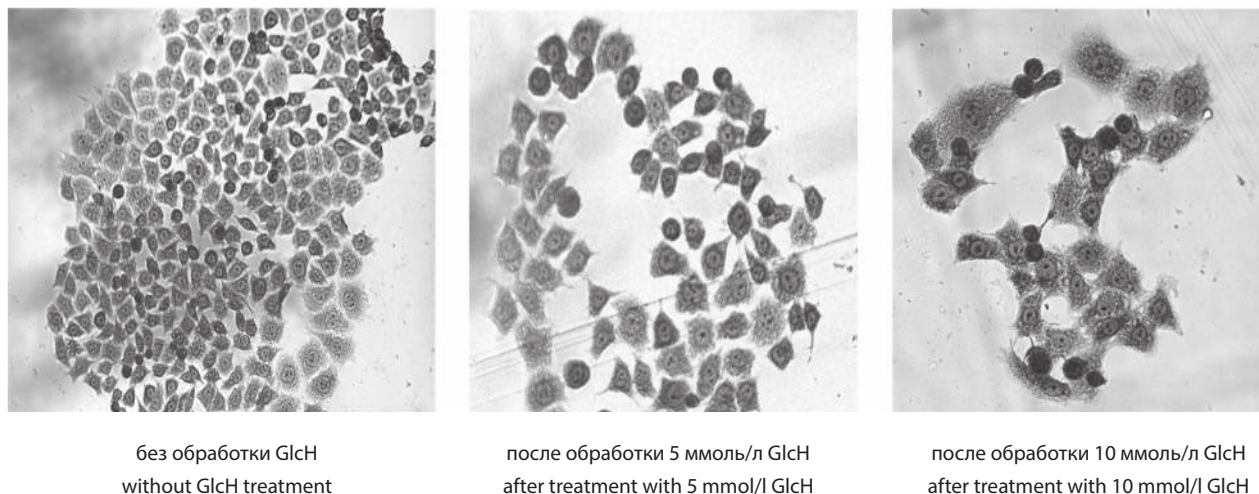


Рис. 2. Клоногенная выживаемость клеток до и после 24-х-часовой обработки клеток глюкозамин (GlcH) в разных концентрациях.

Fig. 2. Clonogenic survival of cells before and after 24-hour treatment of cells with glucosamine (GlcH) at different concentrations.

Таблица 1/ Table 1

Влияние D- глюкозамина на распределение клеток по содержанию ДНК после культивирования их на питательных средах с разным содержанием глюкозы и сыворотки

The effect of D-glucosamine on the distribution of cells by DNA content after their cultivation on nutrient media with different glucose and serum contents

Содержанию ДНК на клетку DNA content per cell	Состав культуральной среды The composition of the culture medium							
	глюкоза 4г/л 4g/l glucose				глюкоза 1г/л 1g/l glucose			
	10% сыворотки 10% serum	без сыворотки without serum	10% сыворотки +GlcH 1мМ 10% serum +GlcH 1mM	без сыворотки +GlcH 1мМ without serum +GlcH 1mM	10% сыворотки 10% serum	без сыворотки without serum	10% сыворотки 1мМ +GlcH 1мМ 10% serum +GlcH 1mM	без сыворотки without serum +GlcH 1мМ
<2c (суб- G ₁) <2c (sub- G ₁)	6.3±0.5	13.5±1.4	5.3±0.5	8.7±0.9	6.5±0.2	19.4±2.0	6.6±0.8	14.3±1.4
2c (G ₁ -фаза) 2c (G ₁ -phase)	71.5±0.3	74.9±1.8	70.4±0.9	79.5±0.7	61.9±1.3	67.1±0.9	63.9±0.9	66.3±1.3
3c (S-фаза) 3c (S-phase)	15.4±1.6	6.5±0.8	15.2±0.8	7.0±0.7	19.3±1.2	8.9±1.8	18.4±1.2	11.9±1.1
4c (G ₂ /M фазы) 4 c (G ₂ /M phases)	6.8±1.7	5.0±1.0	9.1±0.7	4.8±0.6	12.3±0.8	4.6±0.5	11.2±0.7	7.5±0.8

Примечание. Каждая точка представляет среднее арифметическое значение 3-5 повторов (%) ± стандартное отклонение (M±σ). Жирным шрифтом выделены показатели, достигающие уровня статистической значимости p<0,05.

Note. Each point represents the arithmetic mean of 3-5 repetitions (%) ± standard deviation (M±σ). Bold face indicates indicators reaching the level of statistical significance p<0.05.

пуляции, фрагментации ядерного материала при прижизненной окраске АО (рис. 3).

Морфологический анализ согласуется с цитометрическим анализом распределения ДНК. Очевидно, что обработка клеток PC 12 GlcH в исследованных концентрациях не индуцировала апоптоз. Отсутствие фрагментации ядерного материала и образование цитоплазматических вакуолей указывает на то, что GlcH включает вакуоль/лизосомальный путь деградации клеток PC12.

Обработка клеток ингибиторами гликолиза приводит к снижению уровня АТФ, так 2-DG, GlcH и оксамат снижают уровень АТФ в клетках, при этом 2-DG, GlcH индуцируют аутофагию, оксамат — не индуцирует. Обработка клеток 2-DG, GlcH индуцирует стресс эндоплазматического ретикулума (ER), а обработка ок-

саматом не вызывает стресса ER [6, 17]. Очевидно, что не все эффекты, индуцируемые ингибиторами гликолиза, проявляют корреляцию с уровнем АТФ. Кроме того, показано, что аутофагию индуцируют сахара со свободной аминогруппой [9]. Мы сравнили эффективность индукции аутофагии в клетках PC12 двумя ингибиторами гликолиза: 2-DG и GlcH, со сходной структурой и сходными механизмами действия. GlcH отличается от 2-DG наличием свободной аминогруппы (рис. 4).

Отчетливо видна вакуолизация цитоплазмы в клетках обработанных и GlcH, и 2-DG. При этом в контроле на 400 просчитанных клеток встречается всего одна вакуолизированная, при обработке 10 ммоль/л GlcH вакуолизированных клеток было $68.0 \pm 4.1\%$, а после 10 ммоль/л 2-DG $27.8 \pm 2.3\%$ от общего числа про-

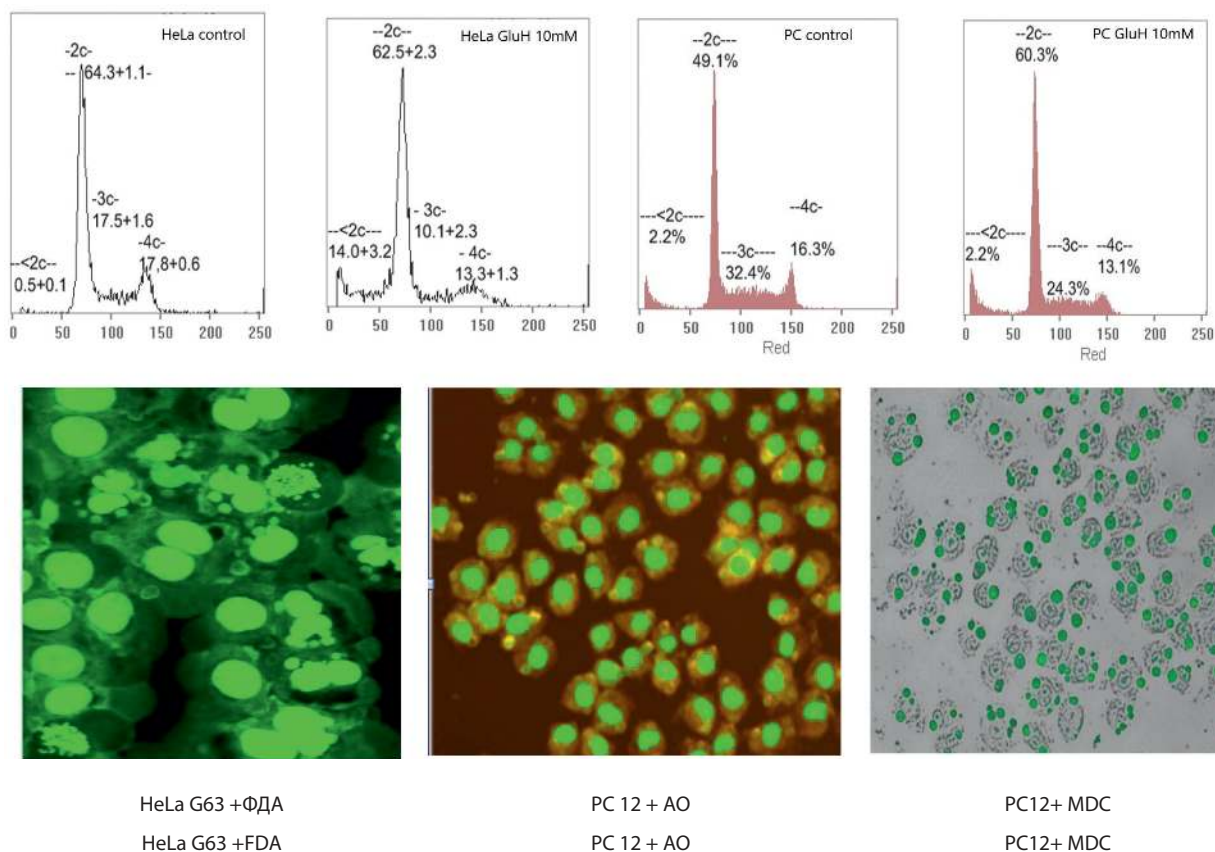


Рис. 3. Цитометрический анализ состава клеточной популяции до и после 24-х-часовой обработки клеток HeLa G63 (A) и PC12 (Б) 10 ммоль/л GlcH. Верхний ряд – гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК.

Нижний ряд – морфологический анализ при окрашивании клеток дифференцирующими флуоресцентными красителями

Fig. 3. Cytometric analysis of the composition of the cell population before and after 24-hour treatment of HeLa G63 (A) and PC12 (B) cells with 10 mmol/l GlcH. Top row – histograms of cell distribution by DNA content.

Bottom row – morphological analysis when staining cells with differentiating fluorescent dyes.

считанных (не менее 500 клеток на точку). Большая эффективность GlcH, по сравнению с 2-DG, согласуется с результатами других исследователей и подчеркивает физиологическую роль аминокислотной группы в составе GlcH [9]. Вакуолизация цитоплазмы является показателем включения нового таргетного пути, включающего перестройку мембраны с образованием везикул в цитозоле [18].

Как было показано выше, клетки линии PC12 были чувствительны к отсутствию сыворотки в среде и менее чувствительны к снижению уровня глюкозы, но эта оценка была проведена с помощью проточной цитометрии по появлению фрагментации ДНК (суб-S1 фракции), возникающей при апоптотической гибели клеток. Поскольку GlcH в исследованных концентрациях в этой клеточной линии апоптоз не индуцировал, но сильно снижал репродуктивную выживаемость клеток и индуцировал образование вакуолей, то мы попытались проследить за кинетикой этого процесса. Клетки были высажены во флаконы с питательной средой, содержащей 10% сыворотки, и через 24 ч после посева в часть флаконов добавили 10 ммоль/л GlcH. Для положительного контроля в часть флаконов с клетками добавили рапамицин 50 мкмоль/л, который является ингибитором mTOR и функционирует как клеточный сенсор на изменения уровня глюкозы и аминокислот, имитирует клеточное голодание, блокируя сигналы, необходимые для роста и пролиферации клеток. В ча-

сти флаконов просто заменили среду на идентичную без сыворотки.

Через каждый час анализировали состояние клеток при помощи инвертированного микроскопа «EVOS». Через 2 ч во флаконах со средой без сыворотки стали появляться глобулы пузырьков (везикул), во флаконах с GlcH и рапамицином также видна вакуолизация и образование везикул, но в меньшей степени. При увеличении продолжительности обработки увеличивалось не только количество, но и размер вакуолей и везикул. Через 3 ч их стало очень много, они отрывались от монослоя и всплывали. После 6-часовой обработки они почти все флотировали. На фото представлены результаты 3-х-часовой инкубации клеток в нормальной питательной среде, в среде без сыворотки, в среде с рапамицином, в среде с 10 ммоль/л GlcH. На всех фото, кроме контроля, видно образование вакуолей и везикул (рис. 5).

Размер везикул оценивали методом лазерной корреляционной спектроскопии. Результатом обработки спектра является гистограмма распределения рассеивающих частиц по размерам (по удвоенным гидродинамическим радиусам). Характерные и выраженные пики такого распределения отвечают разным группам рассеивающих частиц в немонодисперсном образце. Относительная площадь характерного пика гистограммы показывает относительный вклад в спектр рассеяния этими группами рассеивающих частиц (рис. 6).

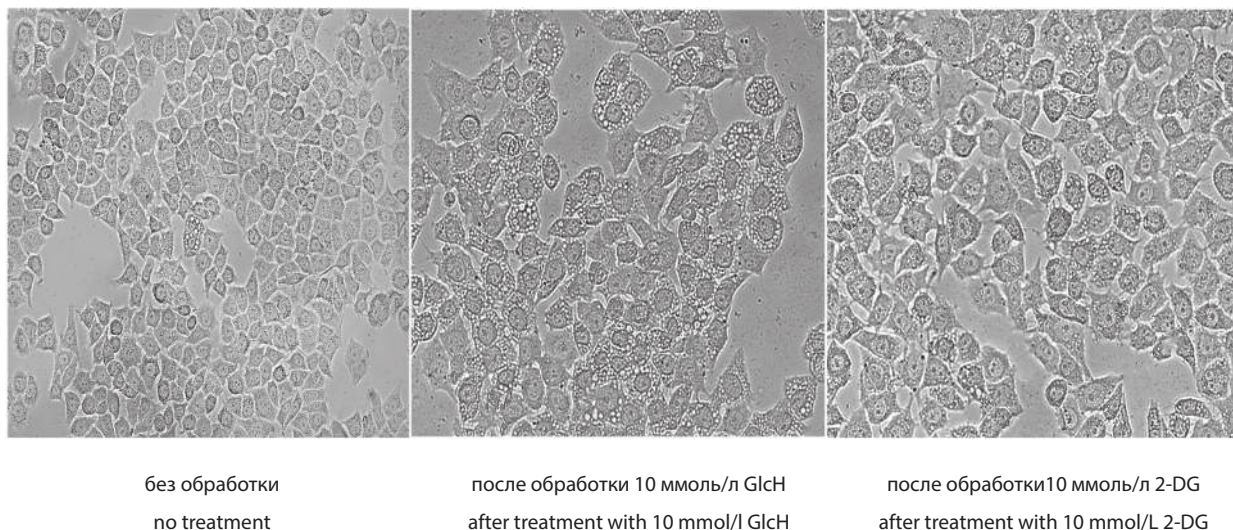


Рис. 4. Вакуолизация цитоплазмы в клетках без обработки, после 24-х-часовой обработки 10 ммоль/л GlcH и после обработки 10 ммоль/л 2-DG.
Fig. 4. Vacuolization of the cytoplasm in cells without treatment, after 24 hours of treatment with 10 mmol/l GlcH and after treatment with 10 mmol/l 2-DG.

Микровезикулы, формирующиеся в результате отпочковывания плазматической мембраны, образуют две фракции частиц: одна в пределах 200 нм и вторая 1000 нм (рис. 6). Известно, что со стороны цитоплазмы плазматическая мембрана покрыта (около 20 нм) волокнистым слоем, который на ультратонких срезах как бы окаймляет небольшие впячивания, ямки. Окаймляющий слой состоит в основном из белка клатрина, ассоциированного с рядом белков. Клатриновый слой покрывает периметр отделяющихся первичных вакуолей. Размер клатриновых везикул около 100 нм. При потере клатринового слоя вакуоли начинают сливаться друг с другом. Можно предположить, что первый пик обусловлен слившимися клатриновыми везикулами. Показано,

что мембраны окаймленных вакуолей содержат сравнительно мало холестерина, что может определять снижение жесткости мембран и способствовать образованию пузырьков. Известно, что GlcN нарушает биосинтез холестерина в клетках [19], поэтому обработка клеток этим веществом может служить фактором инициации аутофагии в клетках. Несмотря на то, что способность GlcN индуцировать аутофагию в различных типах клеток показана рядом исследователей, механизмы этой реакции до конца не выяснены, поскольку они зависят от иницирующего фактора, от дозы инициатора, от продолжительности воздействия, от типа клеток [6, 20].

В ответ на изменения метаболического состояния и клеточный стресс активируются клеточные сигналь-

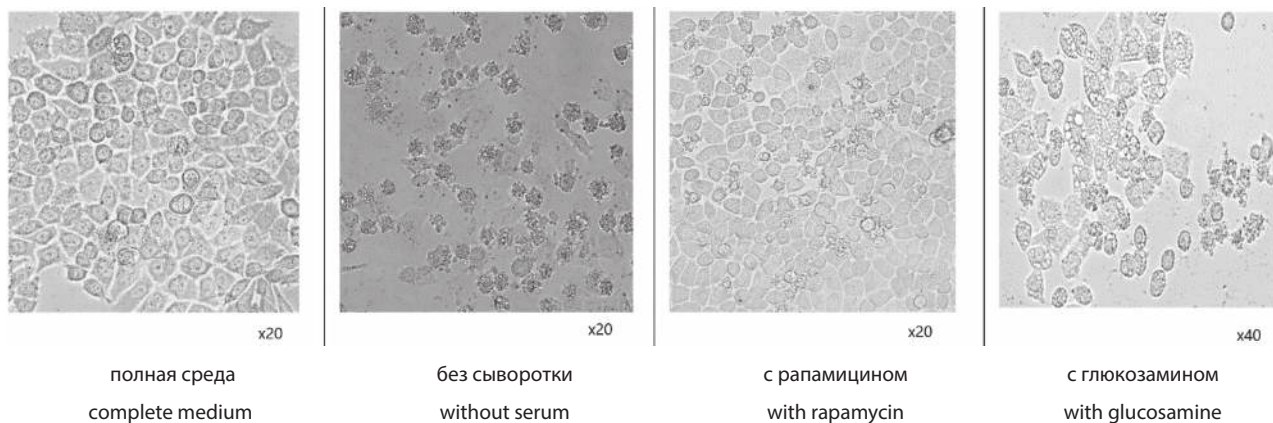


Рис. 5. Морфологические изменения в клетках PC 12 при различных условиях культивирования.

Fig. 5. Morphological changes in PC 12 cells under different culture conditions.

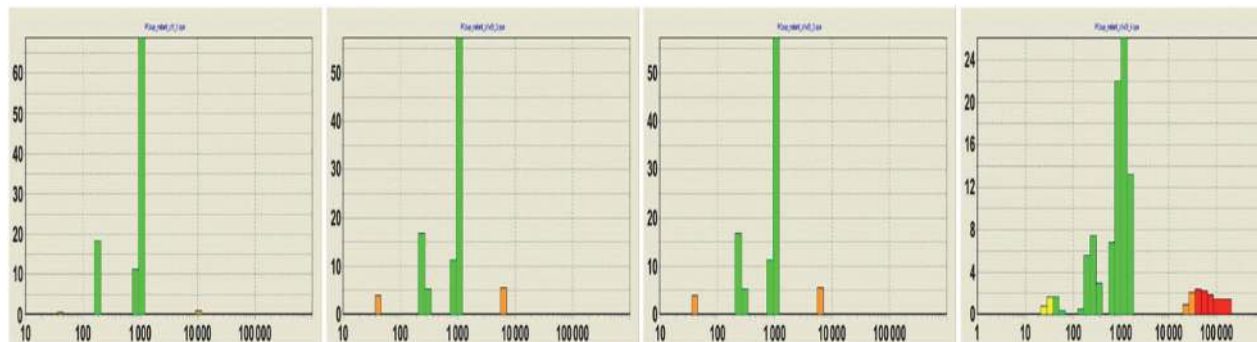


Рис. 6. Распределение по размерам частиц в супернатанте клеток PC 12 по вкладу в светорассеяние. По оси X — диаметр частиц в нанометрах, по оси Y — процентный вклад в светорассеяние. Устойчивые «пики» распределения приходятся на размеры ~ 1000 нм и 200-300 нм. Все остальные «пики» распределения сравнительно не велики по вкладу и неустойчивы.

Fig. 6. Particle size distribution in the supernatant of PC 12 cells according to the contribution to light scattering. On the X axis – the particle diameter in nanometers, on the Y axis – the percentage contribution to light scattering. Stable “peaks” of distribution fall on sizes ~ 1000 nm and 200-300 nm. All other “peaks” of the distribution are relatively minor in terms of contribution and are unstable.

ные механизмы, которые строго контролируют аутофагию [21], такие как mTOR, который функционирует как клеточный сенсор на изменения уровня глюкозы и аминокислот.

Заключение

Таким образом, можно предположить, что форма гибели клеток зависит как от индуцирующего агента, так и от типа клеток. GlcN в концентрациях 1-10 ммоль индуцировал апоптотическую гибель клеток HeLa, но не клеток PC12. Цитотоксический эффект GlcN на клетках PC12 реализуется через индукцию аутофагии, в то время как индуктор окислительного стресса перекись водорода усиливала апоптотическую гибель клеток PC12 [5]. GlcN был эффективнее в индукции вакуолизации клеток, чем 2-DG, что косвенно указывает на роль аминогруппы в индукции аутофагии. GlcN – индуцированный апоптоз в клетках HeLa усиливался снижением уровня глюкозы в питательной среде. В клетках PC12 GlcN-индуцированная аутофагия слабо зависела от содержания глюкозы в среде, но усиливалась снижением содержания сыворотки в питательной среде. Предполагалось, что одной из причин включения апоптотической гибели является GlcN-индуцированное снижение АТФ в клетках, но не все эффекты, индуцируемые ингибиторами гликолиза, проявляют корреляцию с уровнем АТФ. Можно предположить, что в основе механизма действия GlcN лежит ингибирование фосфорилирования m-TOR, при этом не исключается и включение других механизмов, выявлению которых будут способствовать дальнейшие исследования. Сигнальный путь mTOR считается основным регулятором множества взаимосвязанных функций и механизмов, имеющих отношение к росту, пролиферации и гибели клеток. Рапамицин, как индуктор аутофагии, используется для профилактики и лечения ряда заболеваний, но он имеет побочные эффекты, которые создают проблему при хроническом использовании. GlcN безопасен даже при длительном применении у человека, включая пациентов с нарушенной толерантностью к глюкозе или диабетом.

Литература

(п.п. 1-4; 6-11; 15; 17-21 см. References)

5. Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Журишкина Е.В., Степанов С.И., Ибатуллин Ф.М., Торшин В.И. и др. Комбинация низких доз глюкозамина и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре. *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 2019; 63 (2): 41-9
12. Арутюнян А.В., Завачкий Е.И., Козлов В.С., Суясова М.В. Особенности агрегации фуллерена C₇₀ в растворе о-ксилола выявлен-

ные методами динамического светорассеяния. *Письма в ЖЭТФ.* 2018; 108(10): 706–12

13. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии.* Киев, Наукова думка. 1987: 50–4.
14. Гильяно Н.Я., Степанов С.И., Носкин Л.А. Архипова Е.Н., Коневега Л.В. Исследование роли супероксида, оксида азота и ионов металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте перекиси водорода и бета амилоида. *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 2013; 3: 42-6.
16. Гильяно Н.Я., Дуботолова М.М., Носкин Л.А., Коневега Л.В., Степанов С.И., Ибатуллин Ф.М. Цитостатический и радиомодифицирующий эффекты D глюкозамина на клетках человека в культуре. *Радиаци. биол. Радиоэкология.* 2021; 61(2): 145-51.

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. Zahedipour F., Dalirfardouei R., Karimi G., Jamialahmadi Kh. Molecular mechanisms of anticancer effects of Glucosamine. *Biomed Pharmacother.* 2017; 95: 1051-58.
3. Zhang L., Liu W.-S., Han B.-Q., et.al. Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *J Zhejiang University SCIENCE B.* 2006; 7: 608-14.
4. Jung C.W., Jo J.R., Lee S.H., 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 α . *Toxicol In Vitro.* 2012; 26(1): 42-50
5. Giliano N.Ja., Zhurishkina E.V., Stepanov S.I., et al., A combination of low-dose glucosamine D and 2-deoxy-D-glucose enhances the cytotoxic effect on cultured human tumor cells. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2019; 63: 41-9. (in Russian)
6. Caramés B., Kiosses W.B., Akasaki Yu., Brinson D.C., Eap W., Koziol Ja., et al. Glucosamine activates autophagy in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(7): 1843-52.
7. Wang C.W., Kim J., Huang W.P., Abeliovich H., Stromhaug P.E., Dunn Jr.W.A., et al. Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J Biol Chem.* 2001; 276(32): 30442-51.
8. Chen Lv, Lu Wang, Xiongbai Zhu, Wenjun Lin, Xin Chen, Zhengxiang Huang, et al. Glucosamine promotes osteoblast proliferation by modulating autophagy via the mammalian target of rapamycin pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018; 99: 271-7.
9. Shintani T., Yamazaki F., Katoh T., Umekawa M., Matahira Y., Hori S., et al. Glucosamine induces autophagy via an mTOR-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391(4): 1775-9.
10. Freid J., Perez A.G. Clarkson B.D. Rapid hypotonic method for flow cytometry of monolayer cell culture. Some pitfalls in staining and data analysis. *J Histochem Cytochem.* 1978; 26(11): 921-33.
11. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* Cambridge university press. 2005.
12. Arutyunyan A.V., Zavatskii E.I., Kozlov V.S., Suyasova M.V. Features of the aggregation of C70 Fullerene in an o-Xylo solution revealed by the dynamic light scattering method. *Jetp Lett.* 2018; 108: 680–685. (in Russian)
13. Lebedev A.D., Levchuk Yu.N., Lomakin A. V., et al. *Laser correlation spectroscopy in biology [Lazernaya korrelyatsionnaya spektroskopiya v biologii].* Kiev; Naukova dumka;1987. (in Russian)

14. Giliano N.Ya., Stepanov S.I., Noskin L.A., Arkhipova E.N., Konevega L.V. Assessing of the role superoxide, nitric oxide and redox metals in cytotoxic effect of the H₂O₂ and amyloid- β -protein. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 57: 42-6. (in Russian)
15. Seyed Hadi Mousavi, Elham Bakhtiari, Azar Hosseini, Khadijeh Jamialahmadi. Protective effects of glucosamine and its acetylated derivative on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death: Role of reactive oxygen species. *Res Pharm Sci*. 2018; 13(2): 121–9.
16. Giliano N.Ya., Stepanov S.I., Noskin L.A., Konevega L.V., Stepanov S.I., Ibatullin F.M. Cytostatic and radiomodifying effects of D-Glucosamine on human cells in culture. *Radiatsionnaya biologiya. Radiobiology*. 2021; 61: 145-51. (in Russian)
17. Hwang M.S., Baek W.K. Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 13; 399(1): 111-6.
18. Scott V., Klionsky D.J. Delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*. 1998; 10(4): 523-9.
19. Friedman SJ, Cheng S, Skehan P. Mechanisms of cholesterol synthesis inhibition by D-glucosamine. *Can J Biochem Cell Biol*. 1985; 63(12): 1253-7.
20. Haibin Xi, Metin Kurtoglu, Huaping Liu, Medhi Wangpaichitr, Min You, Xiongfei Liu, et al. 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67(4):899-910.
21. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 2491-502.

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; **Дуботолова Мария Михайловна**, студентка, «Петербургский Государственный Университет»;

Носкин Леонид Алексеевич, доктор биол. наук, проф. «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: lanoskin42@mail.ru;

Степанов Сергей Иванович, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики, «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: stepanov_si@pnpi.nrcki.ru;

Арутюнян Александр Владимирович, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: arutb1@mail.ru;

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

Ибатуллин Фарид Миникасимович, канд. хим. наук, «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт», зав. лаб. биоорганической и медицинской химии, e-mail: ibatullin_fm@pnpi.nrcki.ru